

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y
FARMACEUTICA



TESIS DOCTORAL

**Ligandos multidiana, una estrategia alternativa
para el tratamiento de la enfermedad de
Alzheimer**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Natalia Pérez Macías

DIRECTORES

Juan Antonio Páez Prosper
Nuria E. Campillo Martín

Madrid, 2017



DPTO. QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

LIGANDOS MULTIDIANA, UNA ESTRATEGIA ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Memoria presentada por

NATALIA PÉREZ MACÍAS

Para optar al grado de Doctor en Química Médica

Directores de tesis: **Dr. Juan A. Páez Prosper**

Dra. Nuria E. Campillo Martín

INSTITUTO DE QUÍMICA MÉDICA (IQM-CSIC)



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Madrid, 2016

Cuando recordar no pueda, ¿dónde mi recuerdo irá?
Una cosa es el recuerdo y otra cosa recordar

Antonio Machado

A mis abuelas, en especial, a mi abuela Aurora,

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de nuestra vida conoceremos a muchas personas, viviremos diferentes situaciones y tomaremos infinitas decisiones que formarán lo que somos cada uno de nosotros. Hoy cierro una etapa que nunca imaginé que viviría. Ha sido fácil y divertido en algunos momentos y difícil en otros, pero me ha enseñado mucho y todo ello se lo debo a muchas personas, jefes, amigos y familiares que sin duda me han apoyado y demostrado día tras día que todo se puede lograr.

Durante mi etapa en el CSIC he vivido muchas cosas y por ello quiero dar las gracias, en primer lugar, a mis directores Juan y Nuria por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto, por lo que me habéis enseñado y por las grandes conversaciones arreglando el mundo.

A mi compañero y gran amigo Pedro, por tu risa contagiosa, por tu entusiasmo y por hacer que todo parezca más fácil.

A mi compañera Emilia, por tu comprensión, por tu cariño y por abrir mi lado creativo.

A la Dra. Concepción Pérez, no sólo por realizar los ensayos de inhibición enzimática y competición, también por el buen trabajo, tu apoyo y los buenos momentos.

Al grupo de la Dra. M^a Isabel Martín-Fontelles, por la realización del ensayo en tejido deferente de ratón para el estudio del efecto cannabinoide.

Al grupo de la Dra. M^a Ángeles Martín Requero del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, por la realización del estudio de viabilidad celular en modelos celulares de Alzheimer.

Al grupo de la Dra. María López de Ceballos del Instituto Cajal del CSIC, por la realización del estudio en un modelo in vivo de la EA.

A mi tutor, el Dr. José Carlos Menéndez del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM, por todas las facilidades.

A Andrea, Guada, Oskia, Paco, Diego, Raúl, Pili, Martín, Sergio, Felipe y todos los compañeros del IQM con los que he compartido tantas historias, cañas y risas en estos años, convirtiéndose en buenos amigos.

A mi familia, a mis padres, porque sois el ejemplo que sigo cada día, por confiar siempre en mí, por apoyarme en todas las decisiones y por mostrarme la persona que soy y la que puedo llegar a ser. A mi hermano Alberto, por la complicidad, las risas y el "¿Qué vamos a hacer?". A Estrella, por los buenos momentos, los consejos, por ser la persona perfecta para completar mi familia y presentarme una familia nueva.

A las personas que empezaron siendo compañeros de la universidad, que pasaron a ser buenos amigos y que se han convertido en mi otra familia. Gracias a Paula, Bea, Alicia, Joni, Richi, Marta, Gonzalo y Lidia porque sois indispensables en mi vida y os quiero siempre a mi lado.

A Mónica, por ser una hermana para mí.

Y sin lugar a dudas, tengo que dar las gracias por muchas cosas a Edu, porque no tomo una decisión sin ti, porque me complementas, porque a tu lado no existen dificultades y porque, a pesar de la distancia, cada día te quiero más y más.

A todos vosotros, ¡mil gracias!

ÍNDICE:

	Pág.
FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS	X
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XV
RESUMEN	XIX
SUMMARY	XXIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Aspectos generales	2
1.2. Etiología de la enfermedad	2
1.3. Tratamiento actual de la enfermedad de Alzheimer	3
1.4. Mecanismos implicados	5
1.5. Aproximación a las terapias multidiana	7
1.6. El sistema cannabinoide en la enfermedad de Alzheimer	9
1.7. El sistema colinérgico en la enfermedad de Alzheimer	11
1.8. β -secretasa (BACE-1)	13
1.9. Antecedentes del grupo de investigación	17
2. OBJETIVOS	20
3. DISEÑO	25
3.1. Diseño de nuevos derivados carbonílicos de indazol	26
4. QUÍMICA	33
4.1. Introducción	34
4.2. Síntesis de derivados carbonílicos de 1-indazolilo	38
4.2.1. Preparación de 3-hidroxiindazolilcetonas	40
4.2.2. Preparación de derivados carbonílicos de 3-dialquilamino alcoxí-1-indazolilo	42
4.2.3. Preparación de bencilindazolilcetonas	45
4.3. Elucidación estructural	47

	Pág.
5. FARMACOLOGÍA	49
5.1. Farmacología	50
5.2. Ensayo de inhibición de las enzimas AChE y BuChE	51
5.3. Ensayo de competición enzimática	53
5.4. Estudio de inhibición de la enzima BACE-1	56
5.5. Estudio del efecto cannabinoide	58
5.6. Estudio del comportamiento como fármacos multidiana	65
5.7. Estudio de viabilidad celular en modelos celulares de Alzheimer	66
5.8. Estudio de <i>in vivo</i>	69
6. ESTUDIOS COMPUTACIONALES	73
6.1. Estudio computacional de los ligandos multidiana	74
6.1.1. Estudio computacional de los complejos ligando-BuChE	75
6.1.2. Estudio computacional con el receptor cannabinoide CB2	81
6.1.3. Estudio computacional con la enzima BACE-1	84
7. CONCLUSIONES	91
8. PARTE EXPERIMENTAL	94
8.1. Química	95
8.1.1. Aspectos generales	95
8.1.2. Métodos de síntesis	96
8.1.2.1. <i>Síntesis de los derivados de 1H-indazol-3-ol sustituidos en posición N1</i>	96
8.1.2.2. <i>Síntesis de los derivados de 1H-indazol-3-ol sustituidos en posiciones N1 y O3</i>	104
8.1.2.3. <i>Síntesis de los derivados de 1H-indazol-3-ol sustituidos en posición N3</i>	122
8.1.2.4. <i>Síntesis de los derivados de 1H-indazol-3-ol sustituidos en posiciones N1 y N3 a partir de los compuestos sustituidos en N3</i>	123

	Pág.
8.2. Farmacología	124
8.2.1. Ensayo de inhibición enzimática de AChE y BuChE	124
8.2.2. Ensayo de competición enzimática	125
8.2.3. Ensayo de inhibición enzimática de BACE-1	125
8.2.4. Ensayo en tejido deferente de ratón aislado (efecto cannabinoide)	126
8.2.5. Estudio de la acción de agonistas CB2 en modelos celulares de Alzheimer	128
8.2.6. Estudio in vivo	128
8.3 Estudios computacionales	129
9. BIBLIOGRAFÍA	131

FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS

		Pág.
<i>Figura 1</i>	Estructura de los fármacos utilizados para el tratamiento de la EA en la actualidad.	3
<i>Figura 2</i>	Estructura de los agonistas cannabinoides más representativos: WIN55212-2 y JWH-015, pertenecientes a la familia de los aminoalquilindoles; JWH-133 y HU-210, análogos sintéticos de los productos derivados de la planta <i>Cannabis sativa</i> .	10
<i>Figura 3</i>	Esquema representativo de la neurotransmisión colinérgica.	12
<i>Figura 4</i>	Proceso de fragmentación de la proteína precursora amiloide APP.	14
<i>Figura 5</i>	Estructura de los inhibidores de la enzima BACE-1, V10'-V4' StatVal, OM99-2 y CTS-21166.	16
<i>Figura 6</i>	Estructuras de los compuestos cannabinoides evaluados.	18
<i>Figura 7</i>	Diseño de nuevos éteres de indazol mediante el modelo del receptor cannabinoide y la estructura 3D de la enzima BuChE.	19
<i>Figura 8</i>	Estructura general de los éteres de indazol descritos que incluye al PGN33 .	19
<i>Figura 9</i>	Estrategias generales para el diseño computacional de fármacos.	26
<i>Figura 10</i>	Estrategias generales para el diseño computacional de fármacos.	27
<i>Figura 11</i>	Esquema representativo del modelo de farmacóforo.	28
<i>Figura 12</i>	Relación de los puntos del modelo de farmacóforo con los derivados de indazol.	29
<i>Figura 13</i>	Modelo de interacción del derivado NP124 con la enzima BACE-1.	29
<i>Figura 14</i>	Estructuras descritas en bibliografía con propiedades antiinflamatorias (Bencidamina), de inhibición de la agregación plaquetaria (8), de la enzima lipasa (9) y de la recaptación de serotonina y noradrenalina (10).	37
<i>Figura 15</i>	Estructuras descritas en bibliografía con propiedades de inhibición de la traslación bacteriana (11), antivirales (12) y antichagásicas (13).	38
<i>Figura 16</i>	Numeración de los carbonos de la estructura de las indazolilcetonas.	48
<i>Figura 17</i>	Metodología para el estudio farmacológico en el desarrollo de fármacos multidiana.	50

		Pág.
<i>Figura 18</i>	Esquema representativo de los tipos de inhibición enzimática.	53
<i>Figura 19</i>	Representación gráfica de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima BuChE de donepezilo y los compuestos 26 (NP154) , 29 (NP152) , 30 (NP73) , 36 (NP124) , 37 (NP145) , 38 (NP153) , 39 (NP174) , 40 (NP120) , 41 (NP129) , 42 (NP128) y 43 (NP148) .	55
<i>Figura 20</i>	Efecto agonista de los derivados que presentan un efecto similar al WIN55212-2.	61
<i>Figura 21</i>	Representación gráfica de la respuesta inhibitoria de la contracción de los compuestos sintetizados 34 (NP91) y 36 (NP124) ; que presentan un efecto parcial.	61
<i>Figura 22</i>	Representación gráfica de la respuesta inhibitoria de la contracción de los compuestos sintetizados 16 (NP123) , 19 (NP89) , 30 (NP73) , 37 (NP145) y 39 (NP174) que no presentan efecto agonista.	62
<i>Figura 23</i>	Reversión del efecto agonista de los compuestos 22 (NP43) , 34 (NP91) , 40 (NP120) , 41 (NP129) , 43 (NP148) y 45 (NP137) producida por los antagonistas CB1 (AM251) y CB2 (AM630).	63
<i>Figura 24</i>	Reversión del efecto agonista de los compuestos 29 (NP152) , 32 (NP101) y 36 (NP124) producida por los antagonistas CB1 (AM251) y CB2 (AM630).	64
<i>Figura 25</i>	Estructura de las indazolilcetonas seleccionadas para ampliar su perfil farmacológico, 43 (NP148) y 45 (NP137) .	66
<i>Figura 26</i>	Efectos de los compuestos 43 (NP148) y 45 (NP137) sobre (A) la viabilidad celular y (B) la actividad proliferativa.	67
<i>Figura 27</i>	Efectos de los compuestos 43 (NP148) y 45 (NP137) sobre (A) la proliferación celular y (B) el estado de fosforilación de Akt y pRb.	68
<i>Figura 28</i>	Efecto de la adición de los derivados 43 (NP148) y 45 (NP137) en la supervivencia de cultivos primarios de neuronas corticales.	69
<i>Figura 29</i>	Resultado de la prueba de aprendizaje espacial de los animales control o wild type y TgAPP, ambos tratados con vehículo, tras 5 días de entrenamiento.	69
<i>Figura 30</i>	Resultado de la prueba de aprendizaje espacial de los animales control o wild type que han sido tratados con los compuestos 43 (NP148) y 45 (NP137) , tras 5 días de entrenamiento.	70

		Pág.
<i>Figura 31</i>	Resultado de la prueba de aprendizaje espacial de los animales TgAPP que han sido tratados con los compuestos 43 (NP148) y 45 (NP137) , tras 5 días de entrenamiento.	70
<i>Figura 32</i>	Representación esquemática de los sitios de unión de a) AChE y b) BuChE. Figura adaptada.	76
<i>Figura 33</i>	Superposición estructural de las soluciones I y II del derivado 29 (NP152) .	77
<i>Figura 34</i>	Superposición estructural de los derivados 29 (NP152) y 43 (NP148) .	79
<i>Figura 35</i>	Representación esquemática del sitio de unión del complejo BuChE- NP124 .	80
<i>Figura 36</i>	a) Superposición estructural de los derivados 27 (NP152) y 34 (NP124) . Se muestra el puente de hidrógeno en el derivado 34 (NP124) . b) Sitio de unión en la enzima BuChE de ambos derivados.	80
<i>Figura 37</i>	Superposición estructural de los compuestos 22 (NP43) , 29 (NP152) , 43 (NP148) , 45 (NP137) y JWH015 (en color verde). Los residuos del sitio de unión están mostrados en modo <i>stick</i> .	82
<i>Figura 38</i>	Representación esquemática del sitio de unión de los complejos a) CB2- NP43 y b) CB2- NP137 .	83
<i>Figura 39</i>	Interacciones claves de los complejos con la enzima BACE-1 encontrados en el PDB. El complejo 4ACX fue el utilizado como patrón para los estudios de <i>docking</i> (recuadrado en amarillo).	85
<i>Figura 40</i>	Superposición estructural del ligando S8Z en el sitio de unión de la enzima BACE-1. El ligando mostrado en color verde representa las coordenadas reales del mismo dentro del sitio de unión. La estructura en color rosa representa al ligando modificado para la validación de los estudios de <i>docking</i> .	86
<i>Figura 41</i>	Representación esquemática de las interacciones más importantes en el complejo 4ACX.	86
<i>Figura 42</i>	a) Gráfica donde están representados las diferentes soluciones obtenidas para los estudios de 4ACX. b) Energía de interacción (Kcal/mol) junto con el valor cuadrático medio o RMS (del inglés <i>root mean square</i>).	87
<i>Figura 43</i>	Superposición estructural del ligando S8Z y la solución del primer clúster.	87

	Pág.
<i>Figura 44</i>	Superposición estructural de los derivados 22 (NP43) , 37 (NP145) y 45 (NP137) en el sitio de unión de la enzima BACE-1.
<i>Figura 45</i>	Esqueleto de derivados de 3-indazolol.

	Pág.
<i>Tabla 1</i>	Fármacos en fases clínicas II y III para la EA.
<i>Tabla 2</i>	Modelos de farmacóforos descritos.
<i>Tabla 3</i>	Indazolilcetonas sintetizadas con los códigos de referencia.
<i>Tabla 4</i>	Datos de IC ₅₀ de los compuestos estudiados 14 - 45 frente a las enzimas hAChE y hBuChE.
<i>Tabla 5</i>	Datos de la inhibición enzimática (% de inhibición a 10 µM) de los compuestos 14-45 .
<i>Tabla 6</i>	Porcentajes del efecto inhibitorio en la respuesta contráctil para cada concentración de los compuestos 16, 19, 22, 26, 29, 30, 34, 36, 37, 39 - 45 .
<i>Tabla 7</i>	Efecto agonista de los derivados 16 (NP123) , 19 (NP89) , 22 (NP43) , 26 (NP154) , 29 (NP152) , 30 (NP73) , 34 (NP91) , 36 (NP124) , 37 (NP145) , 39 (NP174) , 40 (NP120) , 41 (NP129) , 42 (NP128) , 43 (NP148) , 44 (NP132) y 45 (NP137) .
<i>Tabla 8</i>	Indazolilcetonas que presentan un comportamiento como fármaco multidiaria.
<i>Tabla 9</i>	Relación de los aminoácidos involucrados en los subsitios de AChE y BuChE.
<i>Tabla 10</i>	Interacciones claves de los derivados de 29 (NP152) y 43 (NP148) con la enzima BuChE.
<i>Tabla 11</i>	Interacciones clave de los derivados de 22 (NP43) , 29 (NP152) , 43 (NP148) y 45 (NP137) y JWH-015 con el receptor CB2.
<i>Tabla 12</i>	Interacciones clave entre los derivados 22 (NP43) , 37 (NP145) y 45 (NP137) y los residuos del sitio de unión de la enzima BACE-1.
<i>Tabla 13.</i>	Porcentaje del efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil para cada concentración de los compuestos 22, 29, 34, 40, 42, 43 y 45 , solos o en presencia de los ligandos antagonistas selectivos AM251 (CB1) o AM630 (CB2).

		Pág.
<i>Esquema 1</i>	Hipótesis de partida en el diseño de fármacos multidiana para la EA.	21
<i>Esquema 2</i>	Desarrollo de la nueva familia de derivados carbonílicos de 1-indazolilo a partir del compuesto de referencia PGN33 .	22
<i>Esquema 3</i>	Sustituyentes seleccionados para el estudio de la relación estructura-actividad de los derivados carbonílicos de 1-indazolilo.	31
<i>Esquema 4</i>	Tautomería del 3-indazolol 1 : forma enólica (A) y forma cetónica (B).	34
<i>Esquema 5</i>	Valores de pK _a del 1 <i>H</i> -3-indazolol 1 .	34
<i>Esquema 6</i>	Diferentes vías de condensación del anillo aromático para la formación del derivado 3-indazolol.	35
<i>Esquema 7</i>	Ruta sintética de 1 <i>H</i> -3-indazolol a partir del ácido antranílico.	35
<i>Esquema 8</i>	Ruta sintética de 1 <i>H</i> -3-indazolol 1 a partir del ácido halobenzoico 5 .	35
<i>Esquema 9</i>	Ruta sintética alternativa del derivado 1 <i>H</i> -3-indazolol 1 a partir del ácido antranílico 4 .	36
<i>Esquema 10</i>	Influencia del disolvente en la acilación del compuesto 1 <i>H</i> -3-indazolol.	36
<i>Esquema 11</i>	Ruta sintética A.	38
<i>Esquema 12</i>	Ruta sintética B.	38
<i>Esquema 13</i>	Síntesis de las cicloalquilcetonas.	41
<i>Esquema 14</i>	Síntesis de las arilcetonas halogenadas.	41
<i>Esquema 15</i>	Síntesis de las alquil, fenil, alcoxifenil y heteroarilcetonas.	42
<i>Esquema 16</i>	Síntesis de los dialquilaminoalcoxiindazoles.	43
<i>Esquema 17</i>	Síntesis de los a) pirrolidinilalcoxiindazoles y b) morfolinoalcoxiindazoles.	44
<i>Esquema 18</i>	Síntesis de los piperidinoalcoxiindazoles.	45
<i>Esquema 19</i>	Procedimiento sintético para la preparación de los 1-fenilacetil-3-piperidinoalcoxiindazoles (ruta A).	46
<i>Esquema 20</i>	Procedimiento sintético para la preparación de los compuestos 44 (NP132) y 45 (NP137) (ruta B).	46

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS:

^{13}C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
^1H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
ABP	Bolsillo de Unión Acilo
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AChT	Acetilcolintransferasa
AD	<i>Alzheimer's disease</i>
ADI	<i>Alzheimer's Disease International</i>
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción
AG	Algoritmos genéticos
AKT	Proteína quinasa B
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
Anal.	Microanálisis elemental
ApoE4	Apolipoproteína E4
APP	Proteína Precursora Amiloide
AR	Grupo aromático
AS	Subsitio aniónico
ATP	Adenosina trifosfato
Aβ	β -Amiloide
BACE-1/BACE-2	β - secretasa (β -site APP cleaving enzyme) tipo 1 y 2
BuChE	Butirilcolinesterasa
CAS	Centro catalítico (Center Active Site)
CB1/CB2	Cannabinoide tipo 1 y 2
CB1R/CB2R	Receptor cannabinoide tipo 1 y 2
CDK-5	Quinasa dependiente de ciclina 5
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas

DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enlace de hidrógeno
ES+	<i>Electrospray</i> positivo
EX	Enlace de halógeno
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa 3
H3	Histamina 3
HBA	Grupo aceptor de enlaces de hidrógeno
HBD	Grupo dador de enlaces de hidrógeno
HF	Grupo hidrofóbico
HPLC-MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas
IC	Instituto Cajal
IC50	Concentración de Inhibición del 50%
Inh	Inhibición
IR	Infrarrojo
Ka	Constante de asociación
Kd	Constante de disociación
LGA	Algoritmos genéticos lamarckiano
LPC	<i>Ligand Protein Calculations</i>
MTDD	<i>Multitarget Drug Discovery</i>
MTT	Metiltriazol tetrazolio
NMDA	N-metil-D-aspartato
OT	Agujero Oxoaniónico
P.F.	Punto de fusión

PAS	Centro periférico (<i>Peripheral Anionic Site</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI	Grupo ionizable positivo
pRb	Proteína Retinoblastoma
QSAR	Relación Estructura-Actividad cuantitativa
RAGE	Receptor para compuestos de glicosilación avanzada
RMS	Valor cuadrático medio
RPMI	Medio celular Roswell Park Memorial Institute
sGC	Guanilato ciclasa soluble
SNC	Sistema Nervioso Central
tg	Tiempo de gradiente (HPLC)
TgAPP	Transgénico APP
THF	Tetrahidrofurano
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
tr	Tiempo de retención (HPLC)
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta visible
VdW	Van der Waals
Veh	Vehículo
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
WT	<i>Wild type</i>
Δ^9-THC	Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
ΔSAD	Diferencia de la superficie accesible al disolvente

RESUMEN

La presente tesis doctoral titulada “**LIGANDOS MULTIDIANA, UNA ESTRATEGIA ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**” se enmarca en un tema tan importante como es la investigación de terapias eficaces para luchar contra la enfermedad de Alzheimer.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, probablemente el 60-70% de todas las demencias, y una de las enfermedades con mayor repercusión en los países desarrollados. Estas enfermedades tienen un impacto dramático en la atención médica, así como implicaciones sociales y económicas debido a que los fármacos disponibles proporcionan un tratamiento sintomático temporal pero no detienen la progresión de la enfermedad.

Desde 2003, cuando la FDA aprobó el uso clínico de la memantina, no se ha aprobado ningún otro fármaco para la EA. De hecho, todos los fármacos que se han evaluado en ensayos clínicos durante los últimos años han fracasado.

Debido a la complejidad de la enfermedad, el descubrimiento de fármacos multidiana (MTDD) parece ser una buena opción para encontrar un tratamiento nuevo y eficaz para esta enfermedad.

2. OBJETIVO

El objetivo fundamental del trabajo es desarrollar un fármaco capaz de actuar simultáneamente en dos o tres dianas terapéuticas involucradas en la EA, como son el receptor cannabinoide CB2, la enzima BACE-1 y la enzima BuChE. En este contexto, el objetivo de esta tesis ha sido el desarrollo de una nueva familia de derivados carbonílicos de 1-indazolilo que se comportan fármacos multidiana.

3. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

La selección de esta serie de compuestos se ha basado en distintos estudios computacionales realizados que muestran una alta probabilidad de interacción con el receptor CB2 y las enzimas BuChE y BACE-1. Para ello, se han considerado tres posiciones del esqueleto de indazol susceptibles de ser modificadas.

Una vez definido el esqueleto de la nueva familia de derivados, así como la naturaleza de los posibles sustituyentes mediante técnicas computacionales se ha preparado sintéticamente un conjunto representativo de derivados carbonílicos de indazol para proceder a su evaluación farmacológica que ha consistido en los siguientes estudios:

1. *Ensayo de inhibición enzimática de las enzimas AChE y BuChE.*
2. *Ensayo de competencia enzimática.*
3. *Ensayo de inhibición enzimática de BACE-1.*
4. *Estudio del efecto cannabinoide en tejido deferente de ratón.*

De los resultados obtenidos en los ensayos descritos, se pudo concluir que se han desarrollado compuestos muy interesantes con acción en tres dianas y con las combinaciones de dos de las tres dianas, entre los que cabe destacar:

- Inhibidor de las enzimas BuChE y BACE-1: **37 (NP145)**
- Agonista CB2 e inhibidor de la enzima BuChE: **29 (NP152)**
- Agonista CB2 e inhibidor de la enzima BACE-1: **45 (NP137)**
- Agonista CB2 e inhibidor de las enzimas BuChE y BACE-1: **43 (NP148)**

Una vez conocidos los compuestos más relevantes, se han utilizado las técnicas de *docking* para conocer la orientación y conformación que los ligandos adoptan en la cavidad de cada uno de los receptores (CB2, BuChE, BACE-1).

Los resultados obtenidos en estos estudios han demostrado que esta técnica es capaz de predecir de manera virtual la capacidad de interacción de los ligandos con los receptores objetivo.

Finalmente, se han seleccionado dos compuestos para posteriores estudios farmacológicos, un derivado que actúa en dos dianas como es el compuesto **45 (NP137)**; y un compuesto que actúa en las tres dianas objetivo, **43 (NP148)**.

Por un lado, se ha estudiado la viabilidad celular de los dos compuestos mediante la evaluación de la eficacia de los mismos en la actividad proliferativa de linfocitos inmortalizados de pacientes de la EA, y mediante la valoración del efecto neuroprotector de los compuestos en cultivos de neuronas corticales de rata tratados con el péptido β -amiloide. Los resultados demuestran que ambos derivados revierten la respuesta anómala de los linfoblastos de pacientes de EA, además de la muerte celular inducida por el péptido β -amiloide.

Tras conocer los resultados en modelos celulares, se ha evaluado el efecto de estos dos compuestos en un modelo *in vivo* de la EA. Para determinar las alteraciones cognitivas de este modelo, se ha llevado a cabo el ensayo del laberinto de agua de Morris.

4. CONCLUSIÓN

Como resultado más relevante, hay que destacar que el derivado **45 (NP137)** es capaz de mejorar la capacidad cognitiva, en un modelo animal (ratón TgAPP) de la enfermedad de Alzheimer y, por tanto, es un prometedor candidato como fármaco multidiana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, inhibidor BACE-1, inhibidor BuChE, agonista CB2R, indazolilcetonas, descubrimiento de fármacos multidiana (MTDD).

SUMMARY

The present doctoral thesis entitled as **"MULTITARGET LIGANDS, AN ALTERNATIVE STRATEGY FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE"** belongs to such an important area as the research into effective therapies to fight against the Alzheimer's disease is.

1. INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, probably 60-70% of all dementias worldwide and one of the main causes of disease burden for developed regions. These diseases have a dramatic impact in medical care, as well as important social and economic implications, because the commercial drugs provide a temporary symptomatic treatment but do not stop the disease progression.

Since 2003, when memantine was approved by FDA, it has not been approved any other drug to AD. In fact, all the drugs that are being studied in clinical trials in recent years have failed.

Due to the complexity of the disease, the called multitarget drug discovery (MTDD), seems to be a good option to find a new and effective treatment against this disease.

2. OBJECTIVE

The main objective of this project is to develop a drug able to act simultaneously in two or three therapeutic targets involved AD, such as the cannabinoid receptor CB2, BACE-1 and BuChE enzymes. Thus, in this context, the objective of this work has been the development of a new family of carbonyl derivatives of 1-indazolyl that it behaves as multitarget drugs.

3. METHODOLOGY AND RESULTS

The selection of these compounds has been based on different computational studies showing a high probability of interaction with CB2 receptor, BuChE and BACE-1 enzymes. For this, three positions of the indazole structure were considered liable to be modified.

Once the scaffold of the new family of derivatives was defined by computational techniques, as well as the nature of the possible substituents, a representative set of carbonyl derivatives of indazole were synthesized to proceed to its pharmacological evaluation consisted of the following procedures:

1. *Enzyme inhibition assay of AChE and BuChE enzymes.*
2. *Enzyme competition assay.*
3. *Enzyme inhibition assay of BACE-1 enzyme.*
4. *Study of cannabinoid effect on mouse vas deferens tissue.*

After the obtained results, it could be concluded that very interesting compounds were developed with action in three targets and in two of the three targets, among which are:

- BuChE and BACE-1 enzymes inhibitor: **37 (NP145)**
- CB2 agonist and BuChE enzyme inhibitor: **29 (NP152)**
- CB2 agonist and BACE-1 enzyme inhibitor: **45 (NP137)**
- CB2 agonist, BuChE and BACE-1 enzymes inhibitor: **43 (NP148)**

Once the most relevant compounds were known, *docking* techniques were used to know about the orientation and conformation that ligands made in the cavity of each receptor (CB2, BuChE, BACE-1). The results have shown that this technique is able to virtually predict the capacity of interaction of the ligands with the targeted compounds.

Finally, two compounds were selected for further pharmacological studies, one of them, compound **45 (NP137)** acts in two targets (CB2R and BACE-1) and the other one, compound **43 (NP148)** acts in the three targets.

On one hand, the cell viability of the two compounds was studied by evaluating its effectiveness in the proliferative activity of AD patients' immortalized lymphocytes, and by assessing the neuroprotective effect of the compound in cultured rat cortical neurons treated with β -amyloid peptide. The results show that both derivatives reverse the abnormal response of AD patients' lymphoblasts, besides the cell death induced by β -amyloid peptide.

Following the results in cellular models, the effect of these two compounds was evaluated in an AD *in vivo* model. To determine the cognitive impairment of this model, the water maze Morris Test was carried out.

4. CONCLUSION

As the most relevant result, it is important to emphasize that **45 (NP137)** can improve the cognitive ability in an AD animal model (TgAPP mouse) and, therefore, is a promising candidate as new multitarget drug for the treatment of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, BACE-1 inhibitor, BuChE inhibitor, CB2R agonist, Indazolylketones, Multitarget drug discovery (MTDD).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES

Las demencias, si bien tienen múltiples etiologías, consisten en la pérdida de las capacidades cognitivas que interfieren en el funcionamiento social u ocupacional. En el informe anual de 2015, publicado por la federación ADI (*Alzheimer's Disease International*), se estima que 46.8 millones de personas sufren algún tipo de demencia y se espera que este número se duplique cada 20 años, alcanzando 74.7 millones de personas en el año 2030¹. De acuerdo con las diferentes estimaciones, entre el 2% y el 10% de los casos comienza a la edad de los 65 años².

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, entre el 60-70%, seguida por la demencia vascular, la demencia mixta y la demencia con cuerpos de Levy, según estudios realizados en países desarrollados³.

La enfermedad de Alzheimer es un proceso neurodegenerativo crónico y progresivo que inevitablemente culmina con la muerte de la persona que la padece. Se caracteriza principalmente por la pérdida de memoria, disminución de las habilidades lingüísticas, cambios en la personalidad y otros trastornos cognitivos⁴.

Esta enfermedad tiene una duración de unos 7 a 10 años y pasa por diferentes fases: leve, moderada y severa. En la primera fase, con una duración de 1 a 2 años, la persona puede hacer vida normal, aunque empieza a padecer una leve alteración de las funciones cognitivas. En la segunda fase, con una duración de 2 a 3 años, comienza a notarse una pérdida importante de memoria y disminuyen ciertas habilidades. En la última fase, la persona es totalmente dependiente para realizar cualquier actividad. La progresión tan lenta y duradera de la enfermedad causa un tremendo impacto en la vida de los familiares tanto en el ámbito emocional como en el económico. Por este motivo, es de suma importancia encontrar un tratamiento eficaz para las enfermedades neurodegenerativas, particularmente para la enfermedad de Alzheimer⁵.

1.2. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La etiología de la enfermedad, es decir, el origen o la causa de la enfermedad, no se ha podido desvelar completamente poniendo en evidencia que se trata de una enfermedad compleja y multifactorial⁶.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza principalmente por la formación de placas de amiloide, de ovillos neurofibrilares y por una elevada pérdida neuronal. Las placas neuríticas, también llamadas placas amiloides o placas seniles se forman por el depósito de una proteína en los espacios interneuronales de la sustancia gris del cerebro. Su principal componente es el péptido β -amiloide que se genera a partir de la proteína precursora amiloide APP⁷.

Por otro lado, los ovillos neurofibrilares son estructuras intracelulares compuestas predominantemente por formas agregadas e hiperfosforiladas de los microtúbulos de la proteína Tau. La proteína Tau modula la organización funcional de las neuronas, concretamente su morfología, crecimiento y polaridad. Para ello, estabiliza a las células neuronales a través de su unión a los microtúbulos. La unión a estos microtúbulos va a depender del estado de fosforilación de Tau. En la enfermedad de Alzheimer, Tau está hiperfosforilada de manera que se acumula perdiendo su capacidad de unión a microtúbulos, lo que contribuye a la degeneración neuronal⁷.

La EA se clasifica en familiar y esporádica⁸. La primera tan sólo ocupa el 3% de los casos y su origen se encuentra en la mutación de la proteína APP y de las subunidades de la proteína γ -secretasa, presenilina-1 y presenilina-2, cuya alteración implica la formación de mayores cantidades del péptido A β . La mayoría de los enfermos serán identificados como casos esporádicos (97% de los casos). La causa de la EA esporádica es aún desconocida pero se ha observado igualmente cantidades elevadas de péptido A β ⁹.

1.3. TRATAMIENTO ACTUAL DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Hasta ahora, tan sólo cinco fármacos han sido aprobados por la agencia FDA¹⁰ (*Food and Drug Administration*) (Figura 1). A pesar de todos los esfuerzos de la comunidad científica, sólo ha sido posible comercializar fármacos que proporcionan un tratamiento sintomático temporal pero que no alteran el curso de la enfermedad.

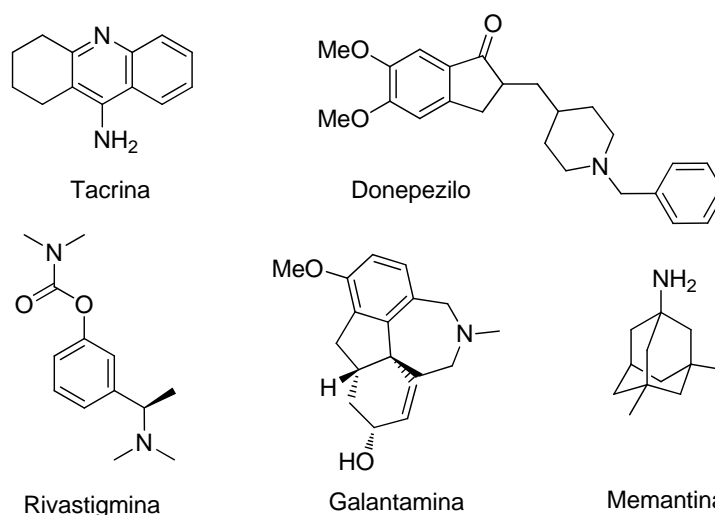


Figura 1. Estructura de los fármacos utilizados para el tratamiento de la EA en la actualidad.

El primer fármaco utilizado para el tratamiento de la EA fue un inhibidor selectivo de AChE, tacrina (*cognex*®, 1996), pero debido a su hepatotoxicidad y a las interacciones medicamentosas clínicamente significativas, únicamente se utiliza en casos de hipersensibilidad a los nuevos inhibidores¹¹.

En la actualidad, se emplean otros tres nuevos inhibidores de AChE y/o BuChE para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer, donepezilo (*aricept*®, 1996), rivastigmina (*exelon*®, 1997) y galantamina (*razadyne*®, 2000). Estos fármacos son empleados en las etapas leve o moderada de la enfermedad y actúan inhibiendo la actividad de la enzima AChE, excepto rivastigmina que también inhibe la enzima BuChE^{12,13,14,15}.

Todos ellos son administrados en cápsulas y comparten efectos secundarios colinérgicos comunes, entre los que se encuentran náuseas, vómitos, diarreas, pérdida de apetito y debilidad muscular, pero se ha observado que los pacientes tienden a desarrollar tolerancia a estos síntomas gastrointestinales.

En algunos ensayos comparativos, rivastigmina ha mostrado tener mayor potencia inhibitoria de AChE que donepezilo y además, tras la aprobación en 2007 de los parches de rivastigmina, se han realizado estudios que muestran un perfil de seguridad y tolerabilidad mejor que en el tratamiento oral, sin diferencias en los niveles de concentración del fármaco en plasma^{16, 17}.

El último fármaco aprobado para el tratamiento de la EA es el antagonista acompetitivo del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) memantina (*ebixa*®, 2003)¹⁸. Éste actúa sobre el receptor de glutamato bloqueando la persistente activación de NMDA para estabilizar el flujo de iones de calcio y reducir la excitotoxicidad. Su utilización está indicada para las fases de moderada a severa de EA donde se ha visto que mejora las capacidades cognitivas y las actividades de la vida diaria, se ralentiza el declive funcional y disminuye el empeoramiento del estado de ánimo y del comportamiento¹⁶.

La necesidad de acabar con el sufrimiento que supone esta enfermedad para los enfermos y familiares hace que una gran parte de la comunidad científica centre sus investigaciones en el desarrollo de fármacos contra la EA. En la tabla 1 se recogen los fármacos que actualmente se encuentran en fases clínicas en los niveles II y III¹⁹.

Tabla 1. Fármacos en fases clínicas II y III para la EA.

Fármaco	Fase clínica	Modo de acción descrito	Compañía
AZD3293	Fase III (2019)	Inhibidor de BACE-1 y BACE-2	Astra Zeneca y Eli Lilly
BAN2401	Fase II (2018)	Anticuerpo monoclonal humanizado del péptido β -amiloide	Biogen y Eisai
CAD106	Fase IIb (2023)	Vacuna que induce anticuerpos del péptido β -amiloide sin activar las células T inflamatorias	Novartis
CNP520	Fase IIb (2023)	Inhibidor de BACE-1	Novartis y Amgen
Crenezumab	Fase II (2017)	Anticuerpo monoclonal humanizado del péptido β -amiloide	Genentech
E2609	Fase II (2017)	Inhibidor de BACE-1	Biogen y Eisai
JNJ-54861911	Fase IIb (2023)	Inhibidor de BACE-1	Janssen
PQ912	Fase II (2016)	Inhibidor de la Glutaminil Ciclasa responsable de la generación del péptido tóxico pGlu-A β .	Probiobdrug AG
ALZT-OP (Cromoglicato sódico + ibuprofeno)	Fase III (2018)	Inhibidor de la agregación del péptido A β con propiedades antiinflamatorias	AZTherapeutics
Aducanumab	Fase III (2020)	Anticuerpo monoclonal humanizado del péptido β -amiloide	Biogen
Azeliragon (TTP488)	Fase III (2018)	Inhibidor del receptor RAGE, modula la actividad glial y reduce la formación de las placas de A β	Pfizer
Gantenerumab	Fase III (2018)	Anticuerpo monoclonal humanizado del péptido β -amiloide	Hoffmann-La Roche
Verubecestat (MK8931)	Fase III (2019)	Inhibidor de BACE-1 y BACE-2	Merck
TRx 0237	Fase III (2016)	Inhibidor de la agregación de la proteína Tau	TauRx Therapeutics

(La fecha mostrada en la fase clínica corresponde con la fecha en la que se realizará el primer análisis de datos del ensayo clínico)

1.4. MECANISMOS IMPLICADOS

Además de los factores característicos de la enfermedad de Alzheimer, existen otros marcadores que también juegan un papel importante en su fisiopatología como son el estrés oxidativo, el desequilibrio hormonal, la inflamación, las alteraciones en el flujo de iones de calcio y la disminución de los niveles de acetilcolina (ACh). Algunos de ellos son también comunes a otras enfermedades neurodegenerativas⁴.

Debido a estos factores patológicos, se han encontrado diferentes dianas a partir de las cuales se busca detener el progreso de la enfermedad. Las principales dianas estudiadas son:

- Enzima BACE-1: a partir de la proteína precursora amiloide (APP), se genera el péptido β -amiloide (β A) por acción de las enzimas β -secretasa (BACE-1) y γ -secretasa. Cuando la producción del péptido $A\beta$ es excesiva, se acumula generando las placas neuríticas. Por ello, se están desarrollando moléculas capaces de inhibir a la enzima BACE-1^{20, 21}.
- Enzima GSK-3: Tau se encuentra hiperfosforilada en la EA de manera que se separa de los microtúbulos para formar autoagregados en los cuerpos celulares, llamados ovillos neurofibrilares, que producen una disfunción neuronal⁵. En el proceso de fosforilación de Tau intervienen dos enzimas: la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) y la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK-5)²². De manera que la inhibición de estas enzimas constituye un objetivo terapéutico de alto interés en la búsqueda de fármacos anti-Alzheimer.
- Enzimas AChE/BuChE: el sistema colinérgico es el responsable de las actividades relacionadas con el aprendizaje y la memoria. En la EA, este sistema se encuentra completamente afectado debido a una reducción de los niveles de acetilcolina (ACh), lo que implica una disminución de las capacidades cognitivas. Para lograr un aumento de este neurotransmisor, una de las opciones más estudiadas es la inhibición de las enzimas AChE y BuChE implicadas en la neurotransmisión colinérgica²¹.
- Receptor central de Histamina H3: se ha observado que el receptor central de la Histamina H3, además de regular la liberación de histamina en el cerebro, también regula la liberación de neurotransmisores, entre los que se encuentra la ACh²³. Por lo que también se está buscando inhibidores de este receptor para mejorar la neurotransmisión colinérgica.
- Receptores CB1/CB2: el sistema endocannabinoide tiene un papel modulador de varios procesos del SNC que están implicados en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Este sistema, en el que están involucrados los receptores cannabinoides CB1 y CB2, ejerce un efecto neuroprotector gracias a las propiedades antiinflamatorias, antioxidativas y antiexcitotóxicas que presenta. Por tanto, los receptores CB1 y CB2 son considerados como una buena diana terapéutica para esta enfermedad.

- Receptores NMDA: el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio. La activación glutamatérgica de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y/o AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) conduce a una entrada masiva de calcio en el interior de la neurona. Como resultado se induce la activación de gran variedad de compuestos neurotóxicos que llevan a la muerte neuronal. Esto es lo que sucede precisamente en la EA, por ello, algunas terapias en estudio tratan de encontrar ligandos capaces de regular la activación/desactivación de estos receptores²⁴.
- Genotipo ApoE4: las mutaciones de ApoE4 son un alto factor de riesgo que puede llevar a la aparición temprana de la EA. Algunos estudios han determinado que la actividad de la isoforma ApoE4 aumenta la concentración de péptido β -amiloide debido a una disminución del aclaramiento del mismo. Además, ApoE4 también está involucrado en la formación de los ovillos neurofibrilares ya que aumenta la actividad de la enzima GSK-3²⁵.

1.5. APROXIMACIÓN A LAS TERAPIAS MULTIDIANA

A pesar de todos los esfuerzos realizados en el desarrollo de fármacos durante las últimas décadas, el número de medicamentos exitosos y de nuevas dianas ha sido más bajo de lo esperado. El descubrimiento de fármacos se ha centrado principalmente en el paradigma “una diana, un fármaco”, a fin de desarrollar un fármaco con alta potencia y alta selectividad. Sin embargo, el enfoque tradicional de una sola diana proporciona un éxito limitado para tratar enfermedades multifuncionales y complejas como es la EA.

En los últimos años, las estrategias alternativas que se han ido desarrollando van desde los fármacos duales que actúan en diferentes sitios de una misma diana de manera que ejerzan al menos dos actividades diferentes^{26,27,28,29}, al diseño y desarrollo de fármacos multidiana, es decir, aquellos que actúan sobre diferentes dianas terapéuticas. Estas estrategias son particularmente adecuadas para enfermedades complejas con múltiples factores patógenos, tales como trastornos neurodegenerativos, cánceres y enfermedades cardiovasculares²³. Hoy en día esta aproximación está siendo aplicada principalmente en la enfermedad de Alzheimer^{30,31,32} y en algunas enfermedades tropicales como la Tripanosomiasis africana³³.

Esta última estrategia puede ser más eficaz ya que hace a los sistemas biológicos más sensibles a la acción de un fármaco y se evitan las posibles interacciones entre varios fármacos. Además algunos modelos sugieren que la inhibición parcial de un pequeño número de dianas cuidadosamente seleccionadas puede ser más eficiente y segura que la inhibición completa de una única diana correctamente seleccionada³⁴.

El objetivo de un fármaco multidiana es actuar selectivamente sobre múltiples dianas de interés terapéutico. Dentro de la estrategia multidiana es posible identificar dos categorías de agentes terapéuticos. La primera categoría es cuando el fármaco actúa en dos o más dianas que pueden estar dentro de las vías individuales de señalización o en las vías dentro de una célula³⁵. En la otra, la respuesta de una diana a un fármaco modula la actividad de otra diana diferente²³.

Algunos estudios recientes en el campo de las enfermedades neurodegenerativas, han conducido a la síntesis de varias estructuras químicamente diversas con perfiles biológicos duales o múltiples para el tratamiento de la EA. El primer grupo de compuestos trata de mantener la inhibición de una de las enzimas colinérgicas, AChE o BuChE y añade diferentes estructuras para que interactúe además con la enzima BACE-1, receptores de NMDA, el receptor CB2, el receptor de histamina H₃^{30,34} o que conste de propiedades antioxidantes; mientras que un segundo grupo trata de desarrollar fármacos no colinérgicos que combinan propiedades quelantes de metales o inhibición de las quinasas que intervienen en la hiperfosforilación de la proteína Tau^{36,37}.

En los últimos años se ha estudiado la efectividad y la seguridad de la utilización de los dos tipos de fármacos comercializados (inhibidores de la enzima AChE y antagonistas del receptor NMDA) de manera simultánea para valorar si se observa un efecto sinérgico en la respuesta^{38,39,40,41}. La dificultad se encuentra en que, al tratarse de dos formulaciones distintas, las propiedades farmacocinéticas, el metabolismo y la biodisponibilidad varían. Por ello, se están desarrollando nuevas estructuras híbridas que combinen en una misma molécula inhibidores de AChE y antagonistas del receptor NMDA unidos por un espaciador⁴².

La aproximación multidiana más estudiada hoy en día es aquella que combina inhibidores colinérgicos e inhibidores de la enzima BACE-1^{43,44}. Los inhibidores de AChE únicamente alivian los síntomas de la EA a corto plazo, pero no detienen el progreso de la enfermedad, por ese motivo es interesante aplicar las propiedades de los inhibidores de BACE-1 que participan directamente en el mecanismo de síntesis de las placas β -amiloide. Un efecto sinérgico en estas propiedades podría ser una solución eficaz a la enfermedad de Alzheimer.

Otro tipo de fármaco multidiana son los que combinan los efectos de la inhibición de la enzima AChE y la inhibición del receptor histamina H₃^{45,46}. El bloqueo de este último receptor provocaría un aumento de los niveles de ACh en el cerebro, de manera que, al unir los efectos de ambos inhibidores, se podría producir una mejora en la neurotransmisión colinérgica en el córtex.

La inhibición colinérgica combinada con las propiedades antioxidantes podría ayudar a disminuir el deterioro que produce la enfermedad debido al estrés oxidativo²³.

En la actualidad, algunos grupos han basado sus investigaciones en el diseño de nuevos compuestos derivados de tacrina y donepezilo para lograr así su participación en otros mecanismos, además de la inhibición de AChE y/o BuChE, tales como la inhibición de la enzima BACE-1 o de la hiperfosforilación de la proteína Tau, o aportar propiedades antioxidantes y/o antiinflamatorias. Algunos resultados ya han demostrado efectos interesantes de sinergismo en sus respectivas actividades^{47,48}.

Como ya se ha mencionado, también se están desarrollando fármacos multidiana que no posean propiedades anticolinérgicas, pero sí otras igualmente interesantes. Generalmente los compuestos estudiados combinan la inhibición de la enzima BACE-1 con otras propiedades. Un ejemplo de ellos son las propiedades quelantes de los metales. Se ha observado que una alteración en la homeostasis de metales como cobre o hierro puede contribuir al efecto que produce la inhibición de la enzima BACE-1 en la patología de la EA. Siguiendo esta línea se están llevando a cabo algunas investigaciones³¹.

Recientemente, se han diseñado moléculas capaces de modular simultáneamente las enzimas BACE-1 y GSK-3³⁷. Esta última enzima, como se ha explicado anteriormente, juega un papel muy importante en la hiperfosforilación de la proteína Tau, por lo que es interesante conocer cuál sería el resultado de la combinación de los efectos inhibitorios de ambas enzimas en la neuroprotección y neurogénesis de las células²³.

En este contexto, el objetivo del trabajo de investigación que se recoge en la presente memoria consiste en el desarrollo de nuevos fármacos multidiana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los fundamentos que justifican las dianas seleccionadas se exponen a continuación.

1.6. EL SISTEMA CANNABINOIDE EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El sistema endocannabinoide es un sistema neuromodulador que participa en varias funciones biológicas importantes. Se trata de una organización compleja formada por los receptores transmembranales CB1 (CB1R) y CB2 (CB2R), los ligandos endógenos (ligandos endocannabinoides) y los mecanismos de síntesis, transporte y degradación de los mismos.

Hay dos tipos de receptores cannabinoides aislados, CB1R⁴⁹ en 1990, y CB2R⁵⁰ en 1993. Ambos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, una de las superfamilias de proteínas transmembrana más estudiadas.

En un principio se creyó que CB1R se encontraba predominantemente en el cerebro y CB2R en las células y tejidos periféricos derivados del sistema inmune. Sin embargo, también se han encontrado receptores CB1 en algunos tejidos periféricos⁵¹ y receptores CB2 en el sistema nervioso central, concretamente en células de microglía y en neuronas^{52,53}.

El efecto neuroprotector de los cannabinoides está basado en las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiexcitotóxicas que presentan. Todo ello los convierte en una nueva aproximación terapéutica para el tratamiento de diferentes patologías de enfermedades neurodegenerativas ya que proporcionan neuroprotección y una reducción de la neuroinflamación⁵⁴.

En el análisis *post mortem* de cerebros obtenidos de pacientes de Alzheimer se ha observado que el sistema endocannabinoide se ve alterado por la patofisiología de la enfermedad⁵⁵.

En cuanto al receptor CB1, en algunos estudios se ha mostrado inalterado mientras que en otros, su expresión disminuye en ciertas regiones cerebrales como son el hipocampo y los ganglios basales, pero no en otras regiones relevantes como es la corteza frontal⁵⁶. En estudios recientes, se ha detectado un aumento inicial seguido de una disminución constante de la expresión del receptor CB1 en la corteza frontal de enfermos de EA⁵⁷.

Por el contrario, el receptor CB2 se encuentra significativamente sobreexpresado en zonas que contienen microglía asociada a las placas neuríticas, como son la corteza entorrinal y el parahipocampo, lo que plantea la hipótesis de que este incremento de la expresión del receptor se produce para contrarrestar la inflamación crónica de la EA^{58, 59}.

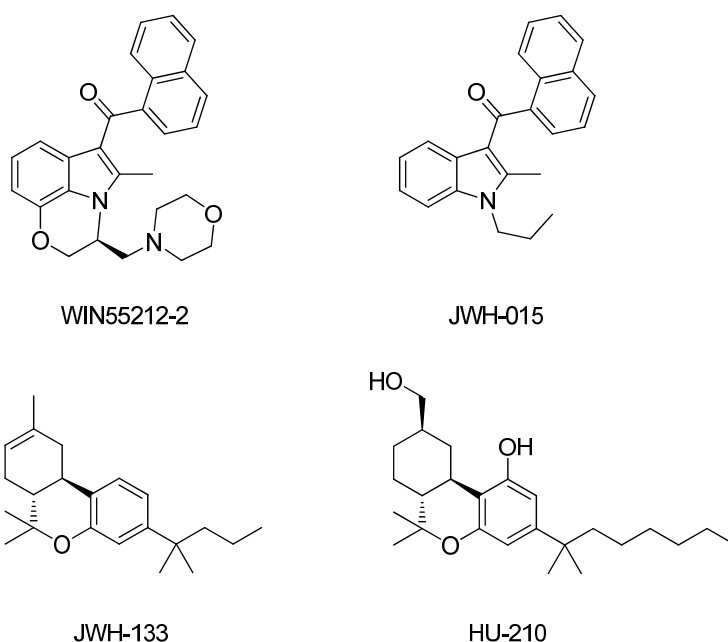


Figura 2. Estructura de los agonistas cannabinoides más representativos: WIN55212-2 y JWH-015, pertenecientes a la familia de los aminoalquilindoles; JWH-133 y HU-210, análogos sintéticos de los productos derivados de la planta *Cannabis sativa*.

Las propiedades antiinflamatorias de los cannabinoides han quedado corroboradas en estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* y es importante destacar que este efecto involucra a ambos receptores. Así, la activación de los mismos por agonistas cannabinoides no selectivos, como HU-210 y WIN55212-2, y el agonista selectivo del receptor CB2, JWH-133 (Figura 2) conduce a una inhibición significativa de la producción microglial de TNF- α , una citoquina inflamatoria que participa en el daño neuronal provocado por la cascada amiloide^{56,60}.

El agonista cannabinoide selectivo de CB2R, JWH-015, ha demostrado que la activación de este receptor potencia la capacidad de las células de microglía para fagocitar el péptido amiloide *in vitro* a través de la expresión del receptor CD40⁶¹ y, mediante un modelo *in vivo* de la EA, se ha podido demostrar que los cannabinoides promueven la migración celular lo que permite la eliminación de péptido amiloide⁶².

Por otra parte, WIN55212-2 previene el deterioro cognitivo inducido por el péptido β -amiloide y muestra su efecto neuroprotector promoviendo la activación microglial⁵⁶. El efecto neuroprotector fue completamente revertido por la acción de un antagonista selectivo de CB2 lo que demuestra que es este receptor el que provoca el efecto⁶³.

En diversos estudios, se ha comprobado que el receptor CB2 no produce neurotoxicidad, inhibe la liberación de factores pro-inflamatorios, reduce la activación microglial y potencia los efectos benignos de la microglía no reactiva, lo que conlleva a una disminución de los niveles de péptido β -amiloide⁶³. Pero además de todo ello, la estimulación de este receptor favorece la neurogénesis⁵⁴.

Por otro lado, se ha descrito que los agonistas cannabinoides, en particular los selectivos de CB2R, disminuyen los niveles de A β en animales TgAPP, contrarrestan la neuroinflamación existente además de mejorar el déficit en aprendizaje y memoria, tras su administración prolongada^{56,62,63}.

Por tanto, el receptor CB2 puede ser considerado como una buena diana terapéutica para afrontar la EA ya que a la vez que se está reduciendo la neuroinflamación y la formación de placas seniles, estimula la neurogénesis, sin desarrollar efectos psicoactivos⁵⁴.

1.7. EL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La importancia de la neurotransmisión colinérgica en algunas funciones del cerebro llevó a varios investigadores a elaborar la hipótesis colinérgica. Esta hipótesis cobró mayor importancia a principios de los años 80, cuando se estudiaba el cerebro de pacientes con EA. El sistema colinérgico es uno de los sistemas moduladores más importantes de la transmisión neuronal, regulando funciones cognitivas como la memoria, el aprendizaje y el desarrollo y diferenciación neuronal; y otras no colinérgicas como la estimulación de la formación de placas neuríticas⁶⁴.

Los síntomas de la EA están relacionados con la alteración de la neurotransmisión y la degeneración de los circuitos neuronales de las zonas del cerebro afectadas. Esto es debido a la disminución del principal neurotransmisor del SNC, la acetilcolina (ACh)⁶⁴.

Como se observa en la Figura 3, la ACh se sintetiza a partir de colina y acetil CoA por acción de la enzima acetilcolintransferasa (AChT). Mediante un impulso nervioso, el neurotransmisor es liberado de la neurona al espacio sináptico donde será reconocido por los receptores nicotínicos y muscarínicos, responsables de transmitir la señal hacia el interior de la célula.

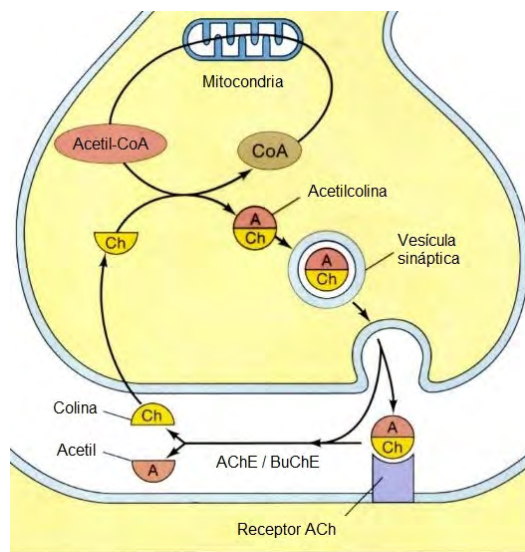


Figura 3. Esquema representativo de la neurotransmisión colinérgica.

Finalmente, la ACh será hidrolizada por las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) o butirilcolinesterasa (BuChE) en acetil CoA y colina, que será transportada de nuevo a la neurona presináptica⁶⁵.

AChE y BuChE son enzimas homólogas que guardan aproximadamente un 50% de identidad en su secuencia de aminoácidos y que son codificadas por diferentes genes en los cromosomas humanos 9 y 3 respectivamente. La enzima AChE se encuentra en las neuronas donde hidroliza la ACh, mientras que BuChE está asociado a las células gliales y se va a encargar de compensar la hidrólisis para así mantener una función cerebral eficiente^{64, 66}.

Ambas enzimas contienen en el centro activo dos zonas diferenciadas muy próximas entre sí: un centro catalítico CAS (*Center Active Site*), en el cual se conserva la triada catalítica Ser, His y Glu; y un centro aniónico periférico PAS (*Peripheral Anionic Site*), que junto con el túnel que une los dos sitios es donde existen las mayores diferencias a nivel de aminoácidos. Son precisamente las diferentes características estructurales de las enzimas las que van a determinar las funciones de cada una de ellas.

La enzima AChE es altamente selectiva por la hidrólisis de ACh, mientras que la enzima BuChE es capaz de metabolizar diferentes moléculas, debido a que la entrada de la garganta tiene mayor tamaño y permite el acceso al CAS incluso de péptidos neuroactivos^{64, 67}.

La enzima AChE es la colinesterasa predominante en cerebros humanos sanos, siendo su actividad del 80% frente al 20% de la enzima BuChE. Sin embargo, algunos estudios han puesto de manifiesto que en la EA se observa una significativa disminución de su actividad en aquellas regiones del cerebro afectadas, mientras que, por el contrario, se produce un incremento progresivo de la actividad de la enzima BuChE^{66, 68}. Durante muchos años, la contribución de la enzima BuChE a la enfermedad ha sido prácticamente ignorada, pero con el tiempo se ha demostrado que esta enzima, además de participar en la hidrólisis de ACh, está involucrada en procesos no enzimáticos⁶⁹.

Varios estudios han concluido que, a través de su PAS, la enzima AChE induce la formación de fibras de β -amiloide tóxico ($A\beta$) mediante cambios conformacionales dados tras su unión al péptido. En cambio, la enzima BuChE desempeña un papel activo en la formación de depósitos de amiloide, asociándose a las placas en su proceso de maduración mediante el cual pasan de una forma benigna a una forma neurotóxica. Esta información respalda el papel tan importante que tiene la enzima BuChE en la enfermedad, lo que la convierte en una buena diana terapéutica^{69,70,71}.

Los inhibidores selectivos de la enzima BuChE, como los análogos de cimserina^{72,73} aunque todavía no han sido ensayados en humanos, han mostrado un aumento de los niveles de ACh en el córtex de ratas y ningún cambio en el nivel de AChE, además de una mejoría en la memoria y el aprendizaje, observado mediante la prueba *Water Maze*. De esta manera, estos inhibidores selectivos podrían normalizar la relación entre las enzimas BuChE y AChE asociada a la enfermedad y aumentar la neurotransmisión colinérgica. Además, se ha observado una reducción de los niveles de APP intracelular y extracelular⁶⁶. Asimismo, la cimserina y sus análogos, que presentan todas estas características y carecen de la toxicidad típica asociada a los inhibidores colinérgicos, como son las náuseas, temblores y lagrimación excesiva⁷⁴.

1.8. β -SECRETASA (BACE-1)

En 1906, Alois Alzheimer determinó la existencia de dos anomalías estructurales en la autopsia de una paciente con demencia: placas neuríticas y ovillos neurofibrilares⁷⁵. No fue hasta ocho décadas después cuando se pudo analizar la composición de dichas placas y así establecer que se trataba de acumulaciones del péptido amiloide β ($A\beta$)⁷⁶.

El péptido amiloide se genera a partir de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP). Ésta consta de 770 aminoácidos y se encuentra de forma más abundante en las neuronas.

Su segmentación es llevada a cabo por la enzima β -secretasa. Ésta produce la escisión en el dominio extracelular para a continuación γ -secretasa fragmentar APP por la región transmembrana, generando el péptido A β . El péptido A β consta de 42 aminoácidos y su formación es el primer paso en la cascada amiloide⁷⁷.

En 1999, cinco grupos de investigación identificaron una nueva aspartil proteasa transmembrana presente de manera abundante en el cerebro, BACE-1, cuyas características coincidían con las conocidas hasta ese momento de β -secretasa. Por ese motivo, β -secretasa fue denominada BACE (β -site APP cleaving enzyme)⁷⁸.

Unos años más tarde, fue descubierta otra enzima homóloga, BACE-2, que presenta aproximadamente un 45% de identidad. Su expresión en el cerebro es muy baja y tras varios estudios, se pudo determinar que no juega un papel importante en la formación del péptido A β ⁹.

Como se observa en el Figura 4, siguiendo la vía amiloidegénica, la enzima BACE-1 va a romper el enlace peptídico Met671-Asp672 de la proteína precursora, desprendiendo el fragmento β -sAPP.

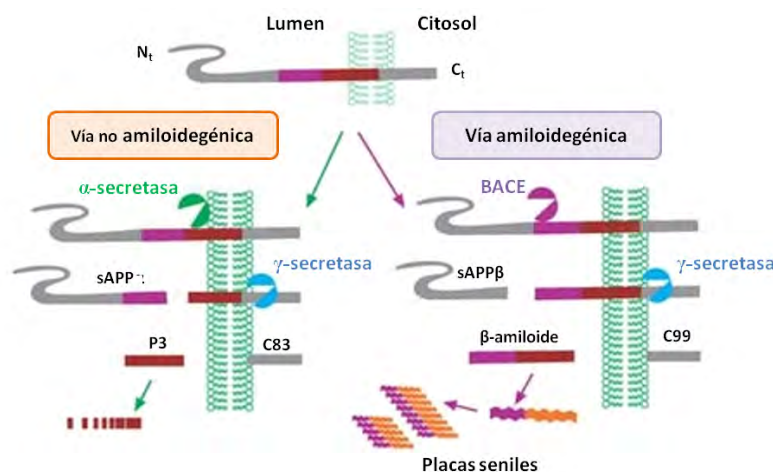


Figura 4. Proceso de fragmentación de la proteína precursora amiloide APP.

A continuación, actuará la enzima γ -secretasa entre los enlaces peptídicos Val712-Ile713 o Ala714-Thr715 liberando el fragmento C99 así como los péptidos A β 40 y A β 42⁷⁹. Normalmente, el péptido de 40 aminoácidos es producido en mayor proporción respecto al de 42 aminoácidos, pero en la EA hay, habrá una producción excesiva del péptido A β 42, cuya acumulación dará lugar a las placas seniles⁷⁸.

Por otro lado, existe una vía no amiloidegénica para la fragmentación de APP, en la que intervienen las enzimas α -secretasa y γ -secretasa. Éstas seccionarán APP por diferentes zonas de la secuencia de aminoácidos, liberando el péptido p3 que no forma depósitos amiloides⁷⁹.

De acuerdo con la "hipótesis amiloide", el aumento de la producción de A β en el cerebro y/o la disminución de la eliminación del mismo son los factores desencadenantes de la EA. Como ya hemos visto, estos péptidos se generan a partir de la proteína APP por acción de las enzimas β -secretasa (BACE-1) y γ -secretasa, un hecho que las convierte en dianas atractivas para el tratamiento de esta enfermedad.

Durante los últimos años, se ha tratado de encontrar inhibidores de las enzimas BACE-1 y γ -secretasa, sobre todo después de observar el éxito obtenido en el desarrollo de fármacos inhibidores de otras proteasas implicadas en otras enfermedades como el SIDA (proteasa VIH) o la hipertensión arterial (renina)⁸⁰.

Los inhibidores de γ -secretasa han encontrado un problema común, la toxicidad⁸¹. Esta enzima interviene en varios procesos fisiológicos importantes como la regulación del crecimiento celular y el catabolismo de las proteínas de membrana, y por este motivo no resulta sencillo encontrar un fármaco capaz de interrumpir la producción del péptido A β sin interferir en las demás funciones.

Sin embargo, la enzima BACE-1 presenta una alta especificidad ya que, gracias a estudios *in vivo*, se ha podido demostrar que su inhibición parcial no conlleva consecuencias fisiológicas importantes. La enzima BACE-1 también participa en el proceso proteolítico de neuregulina-1 y en el correcto funcionamiento de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje. Por ello, es importante considerar los posibles efectos secundarios de la inhibición de esta enzima.

En un estudio *in vivo* con ratones *knock out*, se ha podido observar que la inhibición total de la enzima BACE-1 puede provocar episodios de esquizofrenia y convulsiones epilépticas. Sin embargo, se ha demostrado que una reducción parcial de la expresión de dicha enzima, es decir, una inhibición incompleta, es suficiente para prevenir la acumulación del péptido A β en el cerebro y, además, es capaz de mejorar el rendimiento cognitivo, sin comprometer las funciones normales del cerebro⁸².

El principal problema que ha existido durante años en el desarrollo de inhibidores de BACE-1 ha sido encontrar compuestos con propiedades farmacológicas favorables. La actividad de BACE-1 se desarrolla en los endosomas de las neuronas cerebrales, por lo que los inhibidores de esta enzima deberán ser capaces de penetrar la barrera hematoencefálica y atravesar la membrana neuronal, así como poseer buenas propiedades ADME⁸⁰.

Para la búsqueda de fármacos inhibidores de la enzima BACE-1 se han seguido varias estrategias como el diseño basado en el sustrato, el cribado de alto rendimiento o el diseño basado en fragmentos.

El método basado en el sustrato ha sido un buen punto de partida para el desarrollo de inhibidores de aspartil proteasas y el único que hasta ahora ha dado inhibidores que han sido ensayados en fase clínica en humanos. El primer inhibidor de BACE-1, P10-P4' StatVal, fue descubierto por la compañía *Elan Pharmaceutical* en 1999 cuando intentaban purificar BACE-1 del cerebro humano⁸³. Un año más tarde, *Hong y col.* publicaron la estructura cristalizada de BACE-1 con un nuevo inhibidor peptídico, OM99-2⁸⁴ (Figura 5). Gracias a los rayos X del cristal se pudieron conocer las interacciones del ligando en el centro activo de la enzima, lo cual abrió muchas puertas a otros investigadores⁸⁴.

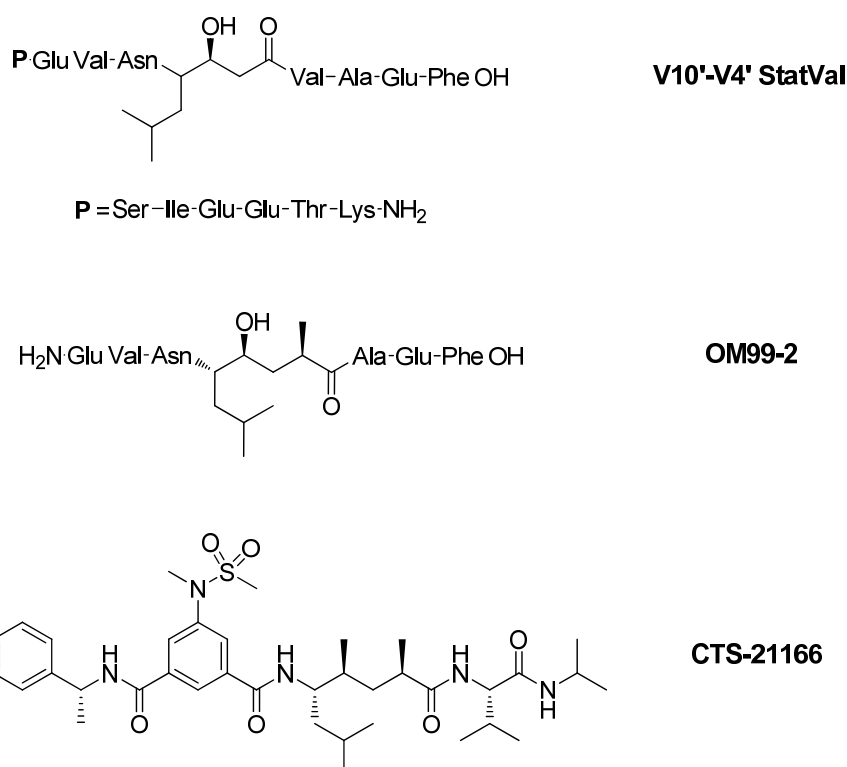


Figura 5. Estructura de los inhibidores de la enzima BACE-1, V10'-V4' StatVal, OM99-2 y CTS-21166.

Durante varios años, se desarrollaron inhibidores peptidomiméticos muy potentes *in vitro*, pero que desgraciadamente carecían de buenas propiedades farmacocinéticas, lo que los hacía poco adecuados para ensayos *in vivo*. De esta manera, comenzó el diseño de inhibidores no peptídicos.

En 2008, llegó a fase clínica el primer inhibidor de la enzima BACE-1. Este inhibidor peptídico fue desarrollado por la compañía farmacéutica *CoMentis*, CTS-21166 (Figura 5). Desde entonces, varias compañías han ensayado en fase clínica sus propios inhibidores^{80, 85}.

La entrada en fases clínicas de los inhibidores de BACE-1 va a permitir conocer cuál es la ventana terapéutica que permite la modulación de la actividad de la enzima para prevenir los niveles del péptido tóxico de A β , sin alterar las funciones normales de la neuregulina-1 y de los canales de Na⁺⁸².

1.9. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis doctoral lleva varios años enfocando su investigación en el desarrollo de fármacos multidiana como estrategia terapéutica para enfermedades neurodegenerativas. Su trabajo se centra en el campo de los cannabinoides, concretamente en el receptor CB2, el cual es considerado como una diana poco explorada y de gran interés para estas enfermedades complejas; y en los inhibidores de las enzimas AChE y BuChE como posible tratamiento para enfermedades neurodegenerativas.

En este sentido se ha descrito en el grupo de investigación un estudio tanto computacional como farmacológico de los cannabinoides más representativos, en el sistema colinérgico como inhibidores de las enzimas AChE y BuChE⁸⁶.

Para ello, se hizo una selección de compuestos cannabinoides entre los cuales se incluyeron agonistas cannabinoides, CP-55,940, JWH-015, WIN55212-2, JWH-133 y GW405833; un fitocanabinoide, Δ^9 -THC; un agonista inverso, JTE-907; dos antagonistas selectivos de CB1 y CB2, AM251 y AM630, respectivamente; y dos ligandos endógenos, anandamida y noladin éter (Figura 6). Todos estos compuestos se compararon con dos de los fármacos comercializados, donepezilo y rivastigmina.

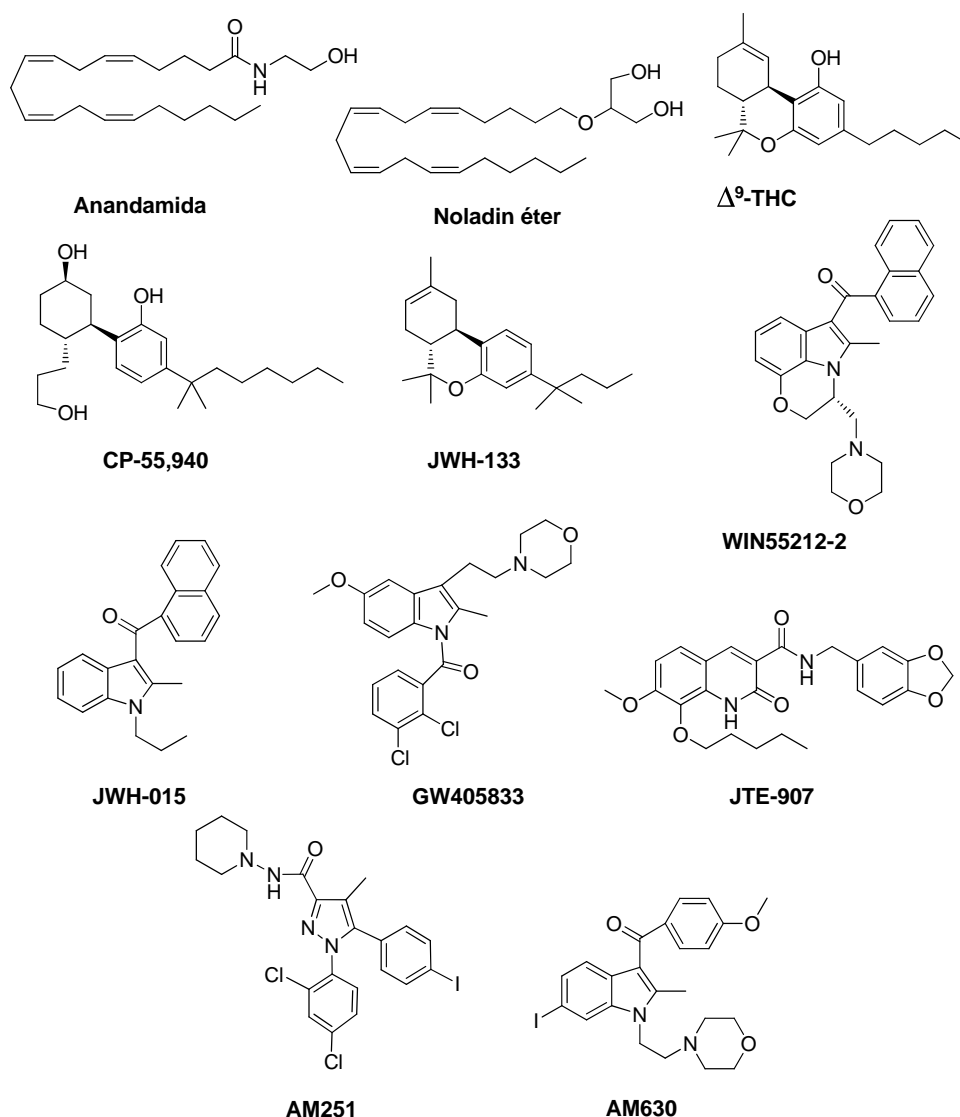


Figura 6. Estructuras de los compuestos cannabinoides evaluados.

Los resultados obtenidos mostraron por primera vez que los agonistas cannabinoides JWH-015, CP-55,940 y JWH-133 se comportaban como inhibidores de las enzimas colinérgicas, con valores de IC_{50} comparables a los de la rivastigmina⁸⁶. Concretamente, JWH-133 presentó una actividad inhibitoria moderada sobre la enzima AChE, mientras que JWH-015 y CP-55,940 se comportaban además como inhibidores de la enzima BuChE, destacando este último con una alta selectividad en relación con la enzima AChE.

Por otra parte, se desarrolló una familia de agonistas cannabinoides derivados de éteres de indazol como agonistas del receptor cannabinoide CB2 que se comportan como inhibidores de la enzima BuChE⁸⁷.

Mediante técnicas de *docking* utilizando un modelo teórico de receptor cannabinoide CB2 desarrollado en nuestro grupo de trabajo⁸⁸ y la estructura tridimensional de la enzima BuChE (Código pdb 1P01)⁸⁹ (Figura 7) se desarrollaron nuevos éteres de indazol que fueron sintetizados y ensayados en diferentes cribados farmacológicos.

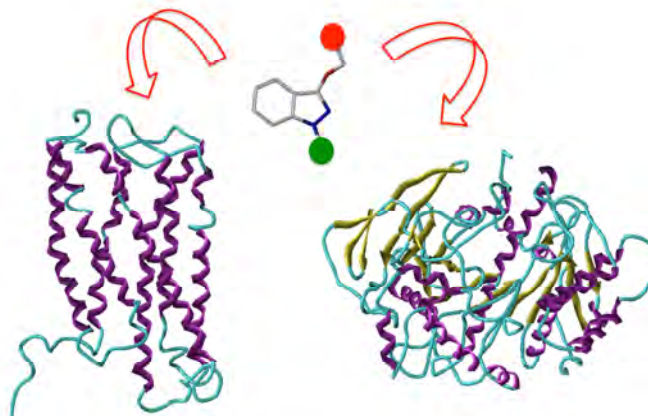


Figura 7. Diseño de nuevos éteres de indazol mediante el modelo del receptor cannabinoide y la estructura 3D de la enzima BuChE.

Mediante esta metodología se describieron tres compuestos multidiana, agonistas CB2R e inhibidores de la enzima BuChE. En la figura 8 se recoge la estructura del compuesto **PGN33**, uno de los éteres de indazol más interesantes que posee además propiedades antioxidantes similares al Trolox utilizado como compuesto de referencia.

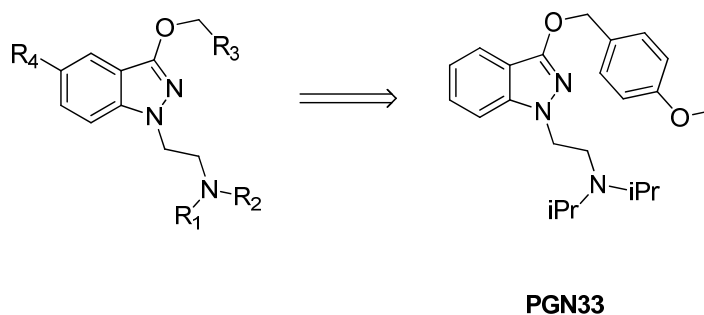


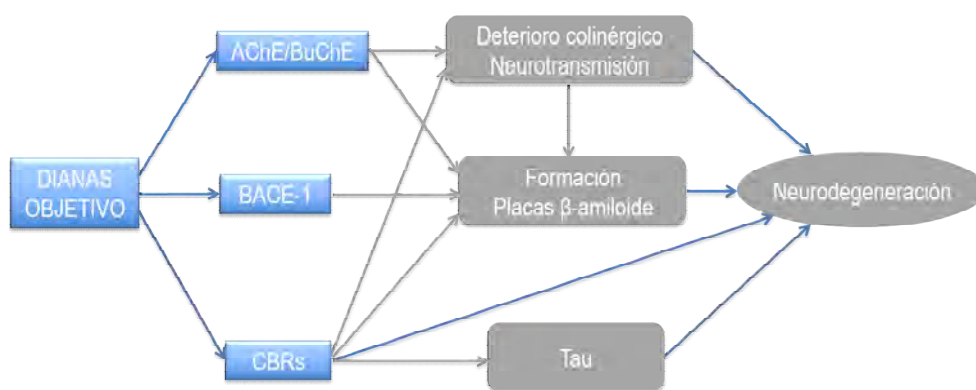
Figura 8. Estructura general de los éteres de indazol descritos que incluye al **PGN33**.

2. OBJETIVOS

La enfermedad de Alzheimer tiene una enorme repercusión económica y social difícilmente cuantificable y para la que no existe una solución terapéutica eficaz, por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos alternativos a los actuales constituye un área prioritaria de investigación.

Desde hace unos años, nuestro grupo de investigación ha enfocado sus investigaciones en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos multidiana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Con todo ello, en el presente trabajo se plantea el desarrollo de nuevos **fármacos multidiana**, derivados carbonílicos de 1-indazolilo, que se comporten como agonistas cannabinoides **CB2**, mejoren la capacidad inhibitoria de la enzima **BuChE** y, además, presenten un efecto inhibitorio de la enzima **BACE-1** (Esquema 1).



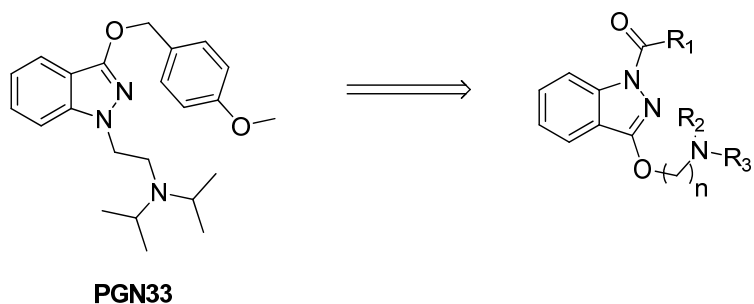
Esquema 1. Hipótesis de partida en el diseño de fármacos multidiana para la EA.

Para alcanzar este objetivo principal, se han seguido las etapas que se describen a continuación:

1. Diseño de nuevos derivados carbonílicos de indazol

Basándose en la estructura de derivados de indazol, previamente descritos en nuestro grupo de trabajo como fármacos multidiana que actúan simultáneamente en el receptor cannabinoide y como inhibidores de BuChE^{87,24}, se pretende desarrollar nuevos derivados que actúen adicionalmente en la enzima BACE-1.

En este sentido, se ha propuesto como objetivo una nueva familia de derivados carbonílicos de 1-indazolilo. La selección de esta serie de compuestos se basa en estudios computacionales realizados en el grupo de investigación, que ponen de manifiesto una alta probabilidad de interacción en el centro activo del receptor CB2 y de las enzimas BuChE y BACE-1 (Esquema 2).



Esquema 2. Desarrollo de la nueva familia de derivados carbonílicos de 1-indazolilo a partir del compuesto de referencia **PGN33**.

Para ello, se considerarán diferentes posiciones susceptibles de ser modificadas, el sustituyente en posición 6, el grupo unido a la función éter y el sustituyente del grupo carbonílico de la posición 1.

2. Preparación de derivados carbonílicos de 1-indazolilo

Una vez definido el esqueleto de la nueva familia de derivados, así como la naturaleza de los posibles sustituyentes, se preparará un conjunto representativo de derivados carbonílicos de indazol para proceder a su estudio farmacológico.

Para la obtención de estos nuevos compuestos se proponen diferentes procedimientos sintéticos desarrollados en nuestro grupo de trabajo.

3. Estudio farmacológico de los derivados carbonílicos de 1-indazolilo

Para poder optimizar las propiedades farmacológicas de los derivados carbonílicos de indazol, los compuestos sintetizados serán evaluados mediante los ensayos descritos a continuación:

- Efecto colinérgico:
 - *Ensayo de inhibición enzimática de AChE y BuChE:* cálculo de la IC₅₀ de todos los compuestos en las dos enzimas para conocer su potencia inhibitoria.
 - *Ensayo de competición enzimática:* aquellos derivados que mejores resultados muestren en los ensayos de BuChE y BACE-1, serán estudiados para determinar el tipo de inhibición enzimática que presentan en la enzima BuChE.
- Efecto en la enzima BACE-1:

Ensayo de inhibición enzimática de BACE-1: obtención del porcentaje de inhibición de todos los derivados.

- Efecto cannabinoide:

Estudio del efecto cannabinoide: ensayo en tejido deferente de ratón para conocer el efecto agonista en los receptores CB1 y CB2 de aquellos derivados que mejores resultados hayan mostrado en los ensayos de inhibición de las enzimas BuChE y BACE-1.

- Efecto en la viabilidad celular:

- Estudio sobre la eficacia de los compuestos en la actividad proliferativa de linfocitos inmortalizados derivados de pacientes de Alzheimer esporádico.
- Estudio del posible efecto neuroprotector de los compuestos en cultivos primarios de neuronas corticales de ratas tratadas con el péptido β -amiloide.

- Ensayo *in vivo*:

Estudio del efecto de los compuestos sobre el aprendizaje y la memoria mediante la prueba de aprendizaje espacial (*Water Maze*) en ratones con el péptido β -amiloide humano sobreexpresado (APP Tg2576).

4. Estudio computacional de los derivados carbonílicos de 1-indazolilo

Finalmente, se llevará a cabo un estudio de modelización molecular empleando técnicas de anclaje (*docking*) de los derivados carbonílicos de 1-indazolilo. Para ello, se seleccionarán algunos de los compuestos más interesantes que servirán como modelo para describir la conformación, la orientación y las interacciones de los derivados con los residuos del sitio de unión de cada una de las dianas terapéuticas.

3. DISEÑO

3.1. DISEÑO DE NUEVOS DERIVADOS CARBONÍLICOS DE INDAZOL

Las etapas de diseño y optimización son dos procesos clave en el desarrollo de un fármaco. En general, los fármacos presentan especificidad estructural, es decir, ejercen su efecto mediante la interacción con alguna macromolécula biológica.

Identificada la diana terapéutica involucrada en el proceso biológico que se estudia, y conocida su estructura tridimensional, ya sea de forma teórica o experimental, es posible abordar el diseño de nuevos fármacos que puedan ejercer su efecto en dicha diana.

Teniendo en cuenta que los fármacos ejercen su acción debido a su interacción con una diana terapéutica, el diseño computacional de fármacos se puede clasificar en dos grupos principales (Figura 9) dependiendo de la estrategia empleada:

- Diseño basado en la estructura del ligando. Estos métodos se centran en el estudio de la estructura química de la molécula o ligando con actividad biológica.
- Diseño basado en la estructura de la diana terapéutica. Estos métodos consideran la estructura tridimensional de la macromolécula o diana terapéutica con la que interactúa el ligando.



Figura 9. Estrategias generales para el diseño computacional de fármacos.

Los estudios de *docking* evalúan la actividad potencial de una quimioteca de compuestos, posicionada en el sitio de unión del receptor, a partir de la interacción ligando-proteína. Asimismo, permiten la identificación del modo de unión, es decir, la orientación y conformación que el ligando adopta en la cavidad de la diana, y, menos frecuentemente, se utilizan para identificar el sitio de unión (*blind docking*).

Los estudios de simulación de formación de complejos ligando-enzima se efectuaron mediante el programa FlexiDock^{90,91}. Las estructuras tridimensionales de las enzimas BuChE y BACE-1 corresponden respectivamente con los códigos 1P0I⁸⁹ y 1W51⁹² disponibles en el *Protein Data Bank*⁹³.

La estructura tridimensional de los receptores cannabinoides, como la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G, no está determinada experimentalmente, excepto en el caso de la rodopsina bovina^{94,95} y del receptor β -adrenérgico^{96,97}. No obstante, en nuestro grupo de investigación ha sido desarrollado un modelo tridimensional de la forma activa del receptor CB2 que es el que se ha utilizado en los estudios^{87,98}.

En la presente memoria se han utilizado estudios de *docking* para dilucidar si los compuestos carbonílicos de indazol propuestos pueden interaccionar con las dianas CB2R y BuChE. Por otro lado, empleando estudios de farmacóforo realizados en la enzima BACE-1^{99,100,101,102}, se establece si la nueva familia de derivados carbonílicos de indazol propuestos pueden cumplir los requisitos mínimos para inhibir a esta enzima. Los estudios de *docking* se verán con mayor detalle en el capítulo de estudios computacionales (Capítulo 6, pág. 94).

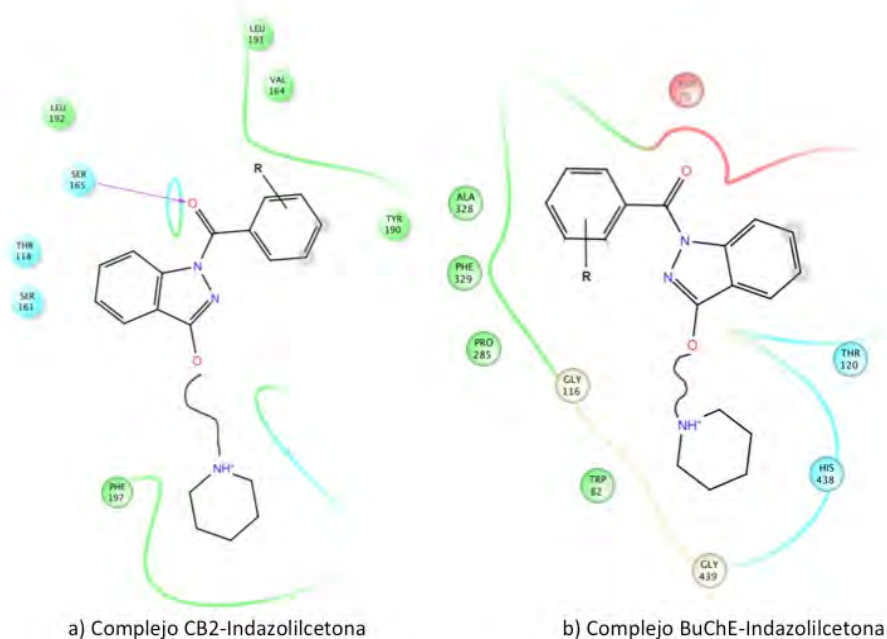


Figura 10. Estrategias generales para el diseño computacional de fármacos.

Efectivamente, tal y como se muestra de manera representativa en la figura 10, los derivados carbonílicos de indazol pueden interaccionar en los respectivos centros activos del receptor CB2 y de la enzima BuChE, de tal manera que la energía de interacción podrá modularse en función de los sustituyentes del indazol.

En relación a la enzima BACE-1, considerando que el 1-(2-diisopropilaminoetil)-3-(4-metoxibenciloxi)indazol, **PGN33** (figura 8) no muestra una actividad significativa, la búsqueda de los sustituyentes adecuados para que los correspondientes derivados de indazolilcetona interaccionen con el centro activo de la enzima es una tarea más complicada. Una búsqueda bibliográfica reveló diferentes modelos de farmacóforo que deben cumplir los inhibidores de la enzima BACE-1^{99,100,101,102}.

Tabla 2. Modelos de farmacóforos descritos.

Modelo de farmacóforo	AR	HF	HBA	HBD	PI
1 (2008)	+	+	+	+	+
	Thr72, Gln73	Tyr71		Phe108, Lys107	Asp32, Asp228
2 (2011)	+	+	+	+	+
			Thr232, Thr72	Gly34	Asp32
3 (2013)	+		+	++	+
4 (2013)	+			+	+
Común	+		+	+	+

(AR) grupo aromático; (HF) grupo hidrofóbico; (HBA) grupo aceptor de enlaces de hidrógeno; (HBD) grupo dador de enlaces de hidrógeno; (PI) grupo ionizable positivo

Analizando los diferentes farmacóforos (Tabla 2), se propuso un modelo con 4 puntos en común caracterizado por un anillo aromático (AR), un grupo dador de enlaces de hidrógeno (HBD), un grupo aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA) y un grupo ionizable positivo (PI) (Figura 11).

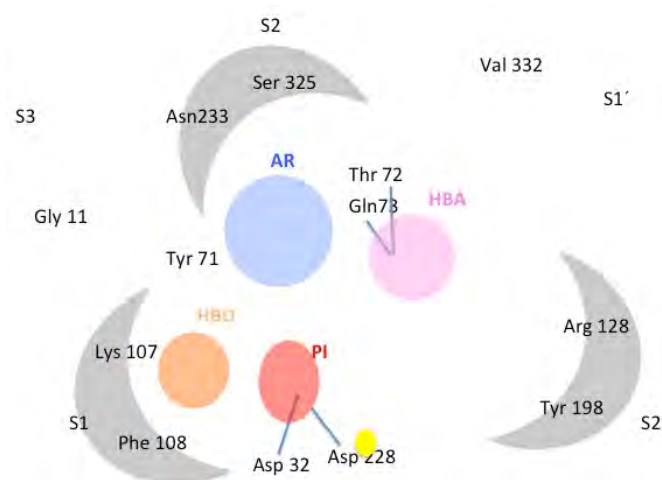


Figura 11. Esquema representativo del modelo de farmacóforo.

Comparando este modelo propuesto por nosotros con los derivados de éteres de indazol, de forma dimensional se puede concluir que esta familia presenta al menos tres de los cuatro requerimientos mínimos necesarios que tiene que cumplir el farmacóforo que inhiba a la enzima BACE-1.

Al introducir el grupo carbonilo en las indazolilcetonas, los derivados carbonílicos de indazol contienen los cuatro puntos del modelo de farmacóforo propuesto, lo cual hace suponer que la actividad de estos compuestos debería mejorar a la de la familia de éteres de indazol (Figura 12).

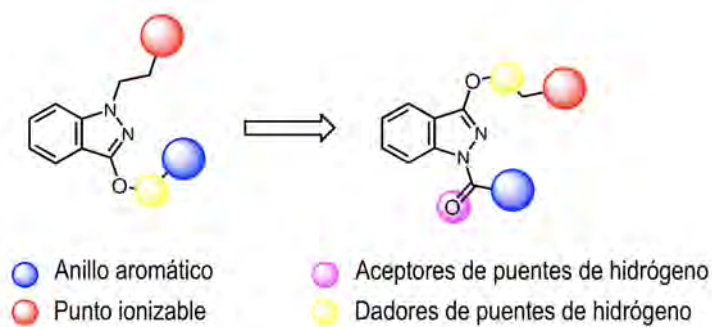


Figura 12. Relación de los puntos del modelo de farmacóforo con los derivados de indazol.

Para confirmar nuestra hipótesis, se llevó a cabo un estudio de *docking* con el derivado (1-naftil)(3-(3-piperidinopropoxi)indazol-1-il)cetona (**NP124**). Como se muestra en la figura 13, el compuesto **NP124** presenta interacciones con los residuos clave Asp228 y Asp32.

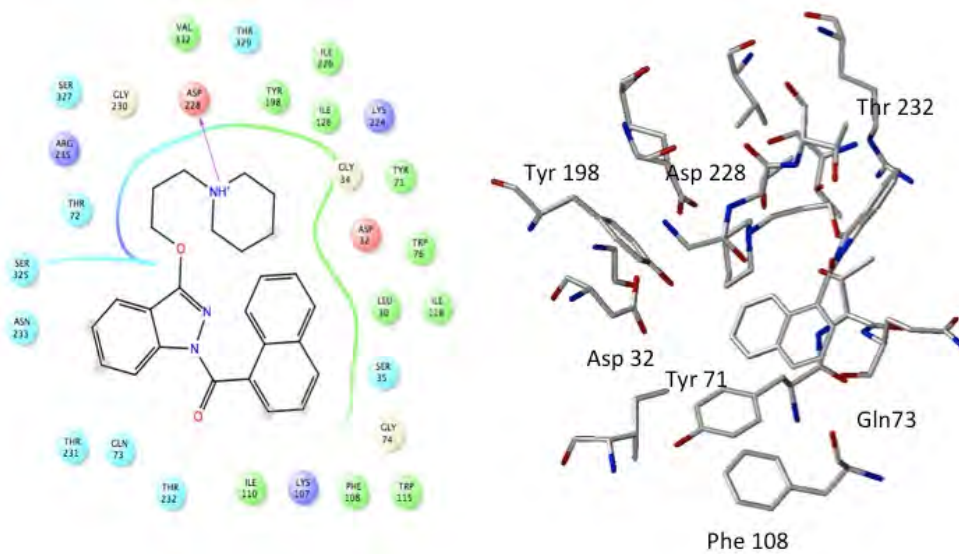


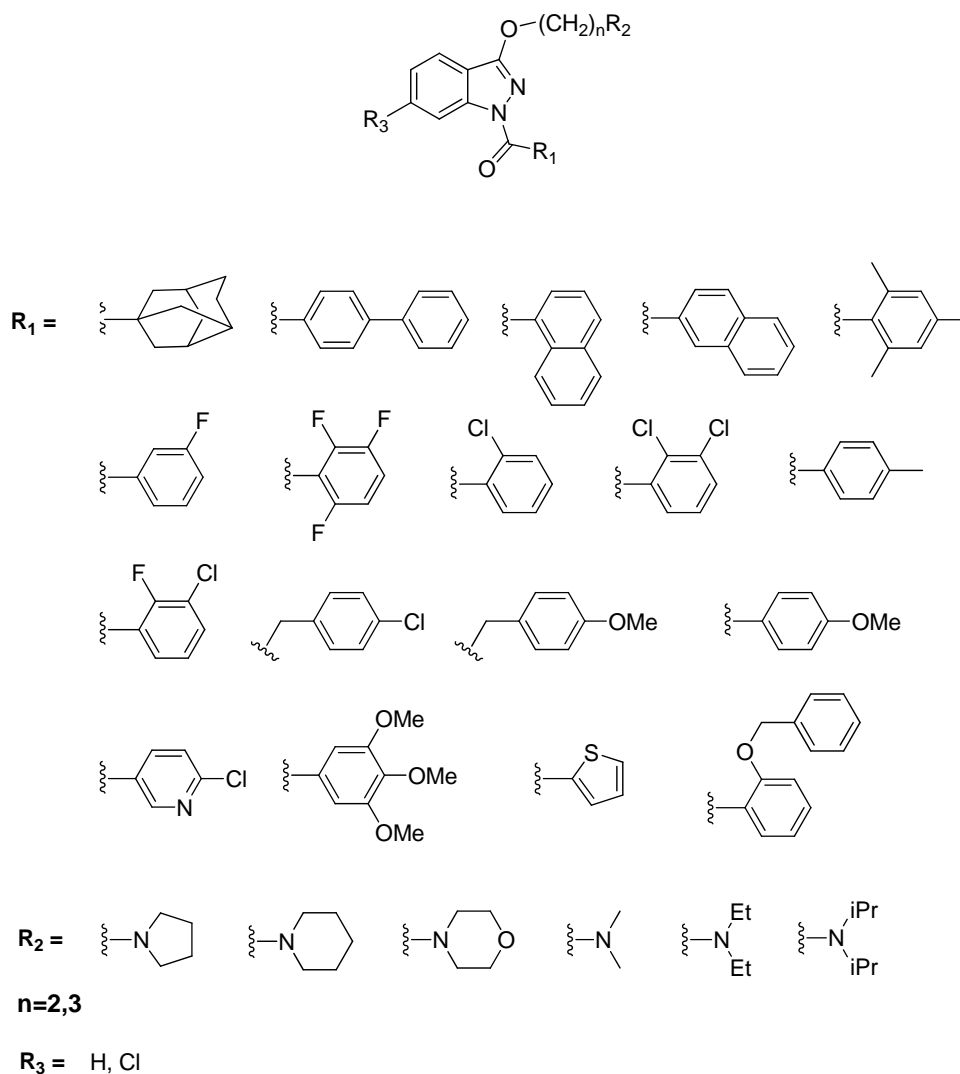
Figura 13. Modelo de interacción del derivado **NP124** con la enzima BACE-1.

En base a los conocimientos adquiridos anteriormente, se diseñó una librería de compuestos con diferentes sustituyentes pertenecientes a la familia de derivados carbonílicos de indazol con el fin de establecer *a priori* la capacidad de cada derivado de actuar como inhibidor mediante estudios de *docking*. Para el diseño de esta librería virtual se tuvieron en cuenta las interacciones con las tres dianas a estudiar, es decir, se plantearon sustituyentes con el fin de optimizar o favorecer el mayor número de interacciones con las tres dianas. Los criterios aplicados para la optimización de las interacciones fueron los siguientes:

1. Optimización de las interacciones con la enzima BuChE.
 - Presencia de sustituyentes aromáticos en R₁ para favorecer la interacción con el subsitio periférico aniónico (PAS) de la enzima BuChE.

- Un nitrógeno terciario que pueda interactuar con el residuo Trp82 de la enzima BuChE.
2. Optimización de las interacciones con el receptor CB2.
 - Un grupo aceptor de hidrógeno que pueda interactuar con uno de los residuos claves del receptor CB2 como es la Ser165 o Ser161.
 - Sustituyentes aromáticos para favorecer las interacciones π - π con los residuos aromáticos del centro activo en el receptor CB2.
 3. Optimización de las interacciones con la enzima BACE-1
 - Un nitrógeno terciario que pueda interactuar los aspárticos, Asp32 y Asp228, que constituyen la diada catalítica, de la BACE-1.
 - Un sustituyente aceptor para la formación de enlaces de hidrógeno.
 - Sustituyentes aromáticos para favorecer las interacciones π - π con los residuos aromáticos del centro activo de la enzima BACE-1.

Por otra parte, se han tenido en cuenta sustituyentes que aporten diversidad estructural desde un punto de vista químico y cuyas estructuras sean accesibles sintéticamente. En este sentido, todos los derivados deben de ser viables experimentalmente en todas sus etapas, bien a partir de derivados de indazol comerciales o accesibles sintéticamente a partir de precursores. Adicionalmente, el resto de los reactivos utilizados en la síntesis debían de ser de origen comercial.



Esquema 3. Sustituyentes seleccionados para el estudio de la relación estructura-actividad de los derivados carbonílicos de 1-indazolilo.

Para el desarrollo de las nuevas moléculas, se consideraron, por tanto, en R₂ sustituyentes con un grupo de amina terciaria, como dimetil, dietil o diisopropilamino, piperidino, pirrolidinilo o morfolino. En R₃ se estudió el efecto de la presencia de cloro. Finalmente, el grupo R₁ fue sometido a la mayor modificación, considerando grupos con gran diversidad en cuanto a sus propiedades físico-químicas. Así, se introdujeron sistemas heterocíclicos como tienilo o piridilo, grupos aromáticos de anillo múltiple separados o condensados como el naftilo o bifenilo. Asimismo, se tuvieron en cuenta grupos arilo sustituido que pudieran contener 1, 2 o 3 sustituyentes, como flúor o cloro, metoxi o benciloxi y el grupo metilo. Finalmente, también fue considerado un grupo no aromático como el adamantilo (Esquema 3).

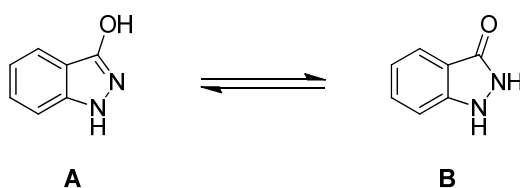
Dada la complejidad del problema ya que tenemos tres receptores y un número muy elevado de derivados, la selección de compuestos como objetivo sintético se ha realizado combinando los estudios de *docking* y el análisis de las relaciones estructura-actividad de las que se disponían a lo largo de la realización del trabajo. La metodología utilizada para los estudios de *docking* será expuesta con mayor amplitud en un capítulo de estudios computacionales (Capítulo 6, pág. 94).

4. QUÍMICA

4.1. INTRODUCCIÓN

El primer compuesto conocido que contenía el sistema del anillo de indazol fue el 1*H*-indazol-3-ol **1** (Figura 14), preparado por Emil Fischer en 1880, mediante condensación del ácido o-hidrazinobenzoico¹⁰³.

El compuesto 1*H*-3-indazolol **1**, puede existir en dos formas tautoméricas: enólica (A) o cetónica (B) (Esquema 4).

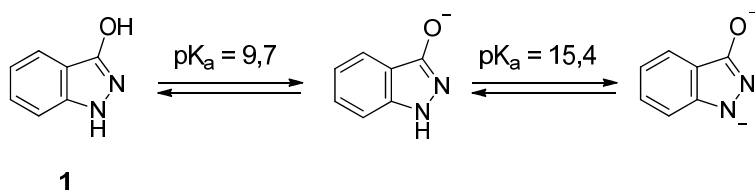


Esquema 4. Tautomería del 3-indazolol **1**: forma enólica (A) y forma cetónica (B).

Durante varios años se ha investigado cuál es el tautómero que predomina en estado sólido y en disolución, mediante análisis de IR, UV y RMN en diferentes disolventes y condiciones. Así, los primeros resultados obtenidos por *Evans y col.*¹⁰⁴ mostraron que tanto en estado sólido como en disolución en cloroformo, inequívocamente se encontraba la forma A como tautómero predominante. En esta línea, *Krishnamurthy y col.*¹⁰⁵ concretaron que la forma enólica está presente en disolventes no polares como ciclohexano y éter, mientras que es la forma cetónica la que se observa en disolventes polares como metanol y agua. En disolventes de polaridad media, como el acetonitrilo, se observan las dos estructuras. En cambio, *Ballesteros y col.*¹⁰⁶ explicaron que el tautómero B es el único presente en estado sólido, mientras que en una disolución de DMSO, coexisten los dos tautómeros siendo A la forma predominante.

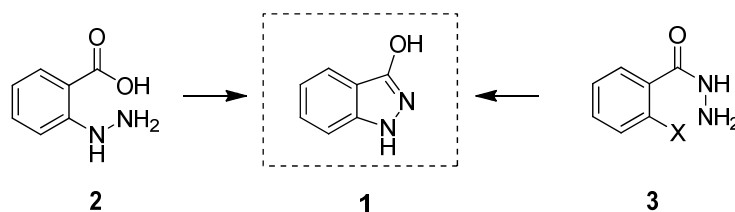
Desde entonces han surgido más estudios que continúan sin dejar claro este aspecto, no obstante la mayoría de ellos apoyan la teoría de que en DMSO la forma A es la que predomina^{107,108}.

En cuanto a las propiedades acido-base del 3-indazolol¹⁰⁵, se han determinado dos valores de pK_a , el primero es el correspondiente a la ionización del protón del grupo hidroxilo y el segundo a la ionización del protón en N1 para formar el dianión (Esquema 5).



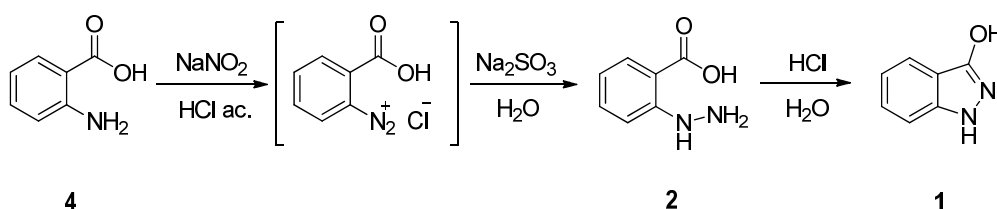
Esquema 5. Valores de pK_a del 1*H*-3-indazolol **1**.

Desde el descubrimiento del 1*H*-indazol-3-ol **1**, se han descrito un gran número de rutas para su síntesis, pero principalmente se siguen dos métodos clásicos para el cierre del anillo de pirazol, partiendo del ácido 2-hidrazinobenzoico **2** o de la 2-halobenzoilhidrazida **3**¹⁰⁸. (Esquema 6)



Esquema 6. Diferentes vías de condensación del anillo aromático para la formación del derivado 3-indazolol.

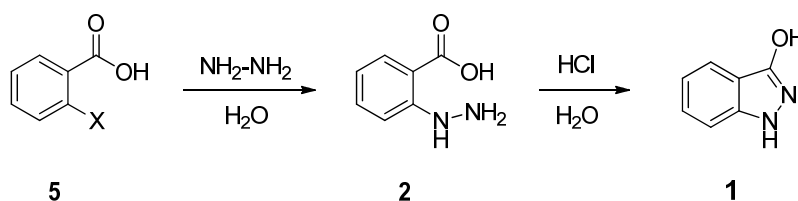
La primera síntesis descrita de 3-indazolol **1** empieza con la formación de la sal de diazonio del ácido antranílico (**4**) que es reducida con sulfitos o dióxido de sulfuro al ácido 2-hidrazinobenzoico (**2**) y finalmente ciclada en medio ácido¹⁰⁹ (Esquema 7).



Esquema 7. Ruta sintética de 1*H*-3-indazolol a partir del ácido antranílico.

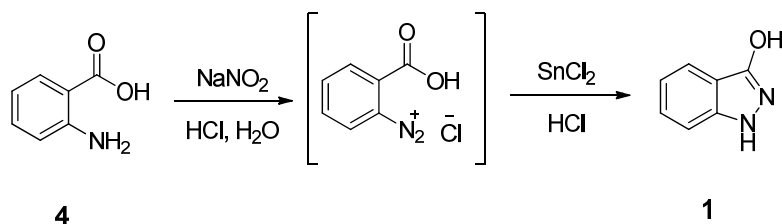
Posteriormente, surgieron otros procedimientos^{110,111,112} para la síntesis de 3-indazolol **1** como los que se muestran en los esquemas 8 y 9.

En la ruta descrita en el esquema 8, la reacción parte del ácido halobenzoico **5** que con hidrazina en medio acuoso y posterior ciclación en medio ácido da lugar a la estructura deseada con buenos rendimientos.



Esquema 8. Ruta sintética de 1*H*-3-indazolol **1** a partir del ácido halobenzoico **5**.

Mientras que en la ruta del esquema 9, el 1*H*-indazol-3-ol **1** se prepara a partir de la formación de la sal de diazonio del ácido antranílico (**4**) seguido de la ciclación con cloruro de estaño en medio ácido.

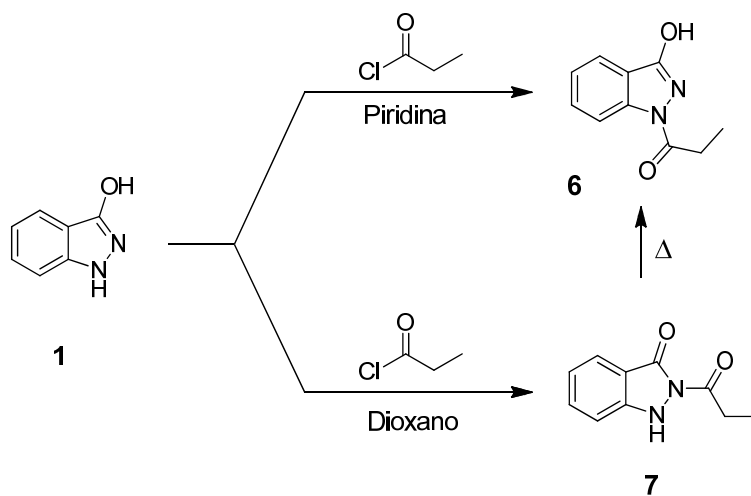


Esquema 9. Ruta sintética alternativa del derivado 1*H*-3-indazolol **1** a partir del ácido antranílico **4**.

Las estructuras de 3-indazolol pueden ser funcionalizadas tanto en los átomos de nitrógeno como en el átomo de oxígeno. Los procesos de síntesis descritos en la bibliografía se centran principalmente en reacciones de N-alquilación con haluros, reacciones de activación del oxígeno y reacciones con compuestos carbonílicos activados^{113,87}.

Según la literatura, la acilación del 1*H*-3-indazolol da únicamente el derivado sustituido en N1 o N2, dependiendo de las condiciones de reacción. Si el disolvente empleado es piridina, el isómero obtenido es el N1-sustituido, mientras que, si se lleva la reacción en dioxano, el único isómero que se forma es el N2-sustituido.

Igualmente si esta última reacción se realiza a temperatura elevada, se produce una transposición y se forma el N1-sustituido^{114,115} (Esquema 10).



Esquema 10. Influencia del disolvente en la acilación del compuesto 1*H*-3-indazolol¹¹⁴.

En la bibliografía se encuentran recogidos una gran diversidad de derivados de indazol, si bien hasta la fecha, no se ha descrito ningún derivado carbonílico de 1-indazolilo como ligando de ninguna de las tres dianas (CB2, AChE/BuChE o BACE-1) consideradas en esta investigación.

La primera estructura publicada con propiedades biológicas fue la *Bencidamina* (Figura 14). Se trata del primer fármaco antiinflamatorio no esteroídico comercializado en 1960 y que, a pesar de no conocerse su mecanismo de acción todavía, continúa siendo utilizado hoy en día. Además, en estudios posteriores se ha visto que también presenta propiedades como analgésico, anestésico local y antimicrobiano¹¹⁶.

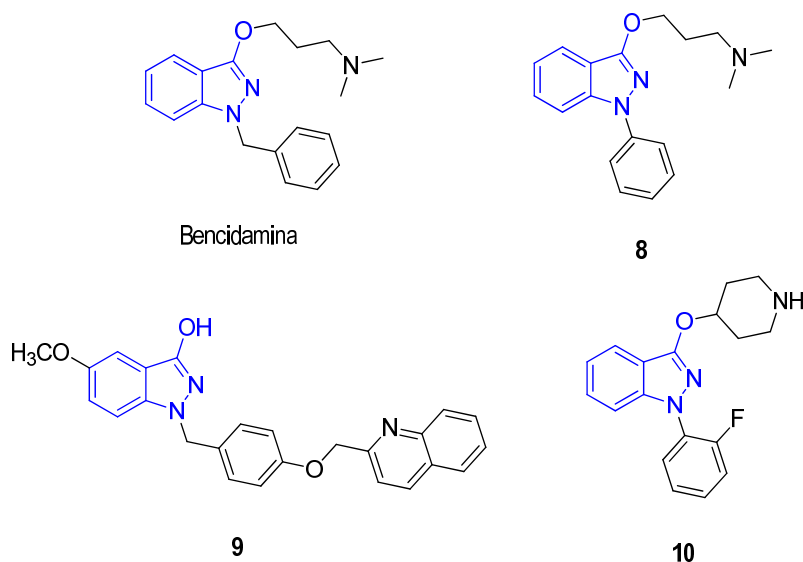


Figura 14. Estructuras descritas en bibliografía con propiedades antiinflamatorias (Bencidamina), de inhibición de la agregación plaquetaria (**8**), de la enzima lipasa (**9**) y de la recaptación de serotonina y noradrenalina (**10**).

Unos años más tarde, *Selwood y col.*¹¹⁷ comprobaron que la Bencidamina era un potente activador de la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC), receptor del óxido nítrico, que participa en diversos procesos fisiológicos. En base a este resultado, diseñaron nuevos derivados análogos de Bencidamina que se comportaban como inhibidores de la agregación plaquetaria (**8**, Figura 14).

*Zoller y col.*¹¹⁸ propusieron otra serie de derivados de 3-indazolol inhibidores de enzimas lipasa para el tratamiento de enfermedades asociadas al metabolismo de ácidos grasos, como la dislipidemia o la aterosclerosis, o a la alteración de los niveles de glucosa, como la diabetes mellitus (**9**, Figura 14).

*Schelkun y col.*¹¹⁹ observaron cómo algunos derivados que contenían un sustituyente aminoalquílico en la posición 3 del heterociclo se comportaban como agentes inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina para el tratamiento de la fibromialgia (**10**, Figura 14).

*Stiff y col.*¹²⁰ plantearon unas estructuras formadas por 1-arylcarbonyl-3-indazolol que actuaban como bioisómeros de un ácido antranílico en la inhibición de la traslación bacteriana (**11**, Figura 15).

*Choong y col.*¹²¹ encontraron actividad antiviral en algunos derivados que presentaban un grupo aminoalquílico en la posición 3 contra la familia *Flaviviridae*, implicada en la enfermedad de la Hepatitis C entre otras (**12**, Figura 15).

Finalmente, *Arán y col.*¹¹² desarrollaron una familia de 5-nitroindazoles que presentaba actividad antichagásica y que carecía de citotoxicidad. Además, esta nueva familia dispone de cierta actividad antineoplásica (**13**, Figura 15).

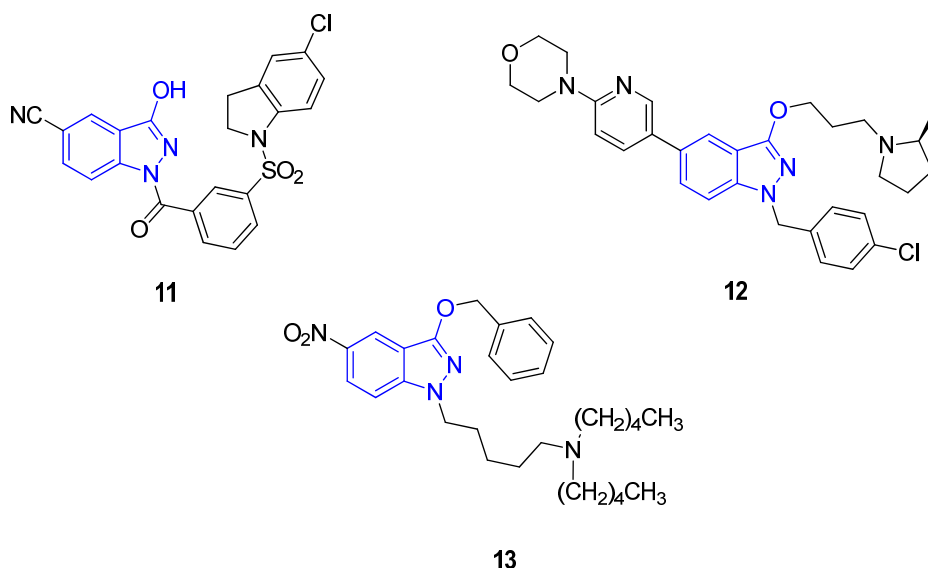
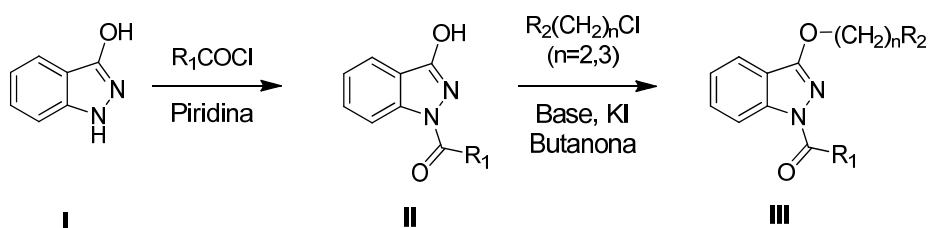


Figura 15. Estructuras descritas en bibliografía con propiedades de inhibición de la traslación bacteriana (11), antivirales (12) y antichagásicas (13).

4.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS CARBONÍLICOS DE 1-INDAZOLILO

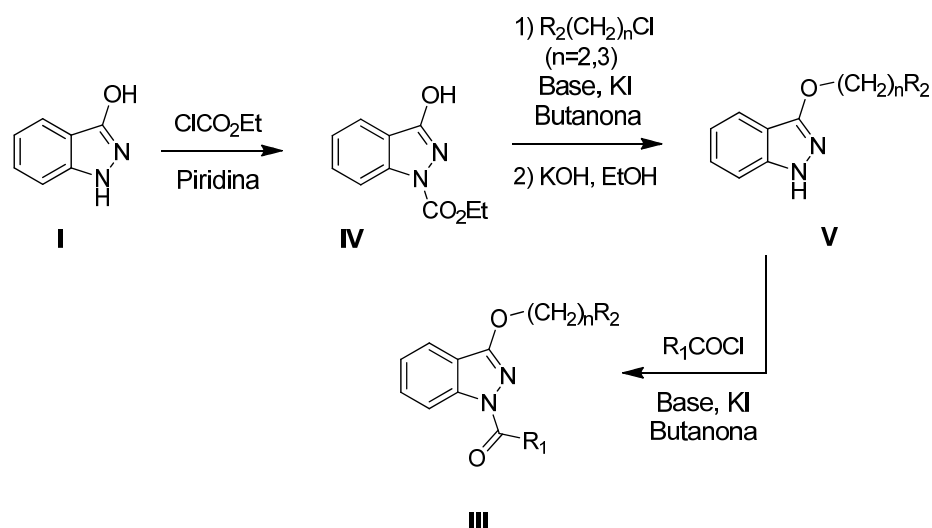
Para la preparación de los derivados carbonílicos de indazol propuestos se consideraron “a priori” dos posibles rutas sintéticas (Esquemas 11 y 12).

La **ruta A** consta de dos etapas (Esquema 11). La primera se trata de una acilación del nitrógeno de la posición 1 del derivado de 1*H*-3-indazolol **I** a partir del correspondiente cloruro de ácido. La segunda etapa consiste en la utilización del procedimiento general de preparación de éteres mediante la reacción de haluros con alcóxidos (Síntesis de Williamson).



Esquema 11. Ruta sintética A.

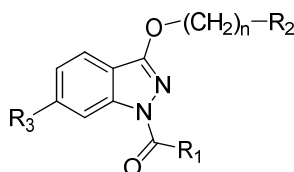
La **ruta B**, en cambio, consta de tres etapas (Esquema 12). En primer lugar, se protege el nitrógeno de la posición 1 (N1) con cloroformiato de etilo para luego introducir los diferentes sustituyentes de la posición 3 a partir de los cloruros indicados. A continuación, se realiza la desprotección del N1 en medio básico y se preparan los derivados disustituídos finales con los distintos cloruros de ácido.



Esquema 12. Ruta sintética B.

En la presente memoria se describe una nueva serie de indazolilcetonas **14-45** que han sido protegidos mediante una patente española presentada recientemente²⁴. Los compuestos han sido preparados utilizando las rutas sintéticas antes mencionadas y se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Indazolilcetonas sintetizadas con los códigos de referencia.



	Código referencia	R ₂	R ₁	R ₃	n
14	NP76	dimetilamino	1-naftilo	H	2
15	NP113	dimetilamino	2,3-diclorofenilo	H	2
16	NP123	dimetilamino	4-bifenililo	H	3
17	NP125	dimetilamino	4-metoxifenilo	H	3
18	NP75	dietilamino	<i>p</i> -tolilo	H	2
19	NP89	diisopropilamino	4-bifenililo	H	2
20	NP117	diisopropilamino	4-metoxifenilo	H	2
21	NP104	1-pirrolidinilo	2-clorofenilo	H	2
22	NP43	1-pirrolidinilo	2,3-diclorofenilo	H	2
23	NP107	1-pirrolidinilo	2,3-difluorofenilo	H	2
24	NP116	1-pirrolidinilo	3,4,5-trimetoxifenilo	H	2
25	NP83	1-pirrolidinilo	2-tienilo	H	2
26	NP154	1-pirrolidinilo	1-naftilo	H	3

	Código referencia	R ₃	R ₁	R ₂	n
27	NP100	morfolino	1-naftilo	H	2
28	NP121	morfolino	2,3-diclorofenilo	H	2
29	NP152	piperidino	1-naftilo	H	2
30	NP73	piperidino	2-naftilo	H	2
31	NP93	piperidino	1-adamantilo	H	2
32	NP101	piperidino	2,3-diclorofenilo	H	2
33	NP111	piperidino	2,3,6-trifluorofenilo	H	2
34	NP91	piperidino	2,4,6-trimetilfenilo	H	2
35	NP94	piperidino	4-cloro-3-piridilo	H	2
36	NP124	piperidino	1-naftilo	H	3
37	NP145	piperidino	1-naftilo	6-Cl	3
38	NP153	piperidino	2-naftilo	H	3
39	NP174	piperidino	4-bifenililo	H	3
40	NP120	piperidino	2,3-diclorofenilo	H	3
41	NP129	piperidino	3-cloro-2-fluorofenilo	H	3
42	NP128	piperidino	2,4,6-trimetilfenilo	H	3
43	NP148	piperidino	2-benciloxifenilo	H	3
44	NP132	piperidino	4-clorobencilo	H	3
45	NP137	piperidino	4-metoxibencilo	H	3

4.2.1. Preparación de 3-hidroxiindazolilcetonas

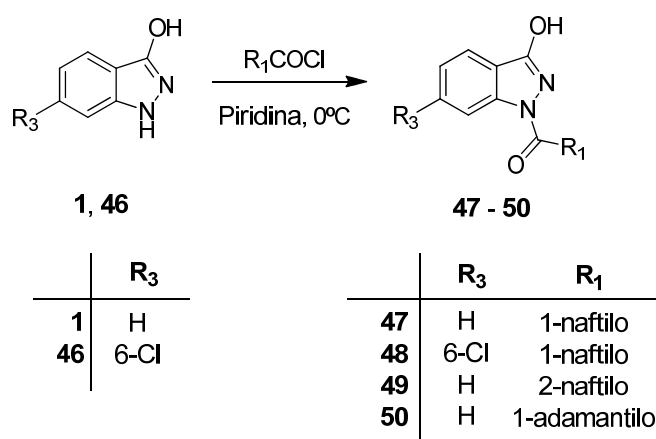
En primer lugar, se prepararon las 3-hidroxiindazolilcetonas a partir del 3-indazolol con los correspondientes cloruros de ácido siguiendo la ruta sintética **A**. Las 3-hidroxiindazolilcetonas obtenidas se pueden clasificar dependiendo de los cloruros de ácido empleados en los siguientes grupos:

1) Cicloalquilcetonas bicíclicas aromáticas o tricíclicas saturadas:

A partir del compuesto **1** se sintetizaron los derivados bicíclicos aromáticos de 1-naftil- **47** y 2-naftilcetona **49** mediante la reacción con los cloruros de 1-naftilo y 2-naftilo, respectivamente.

De manera análoga se preparó la 1-naftil-6-cloroindazolilcetona **48** a partir del 6-cloro-1*H*-indazol-3-ol **46** con el cloruro de 1-naftoilo (Esquema 13). Este compuesto fue preparado previamente en el laboratorio mediante la reacción de diazotación del 2-amino-4-clorobenzoato de metilo con NaNO₂ en HCl diluido, seguido de la ciclación con SnCl₂ en medio ácido¹²².

Todos los derivados sintetizados se prepararon en piridina a 0°C con buenos rendimientos.

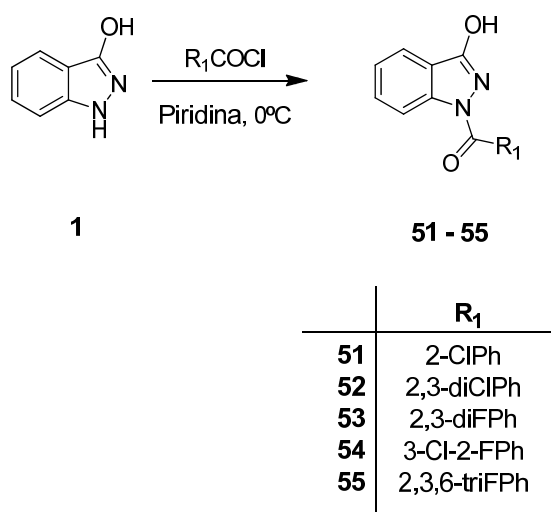


Esquema 13. Síntesis de las cicloalquilcetonas.

Además, se preparó un derivado con un grupo tricíclico saturado, el adamantilo. Así, la reacción de **1** y el cloruro de 1-adamantoilo condujo a la formación de la 1-adamantilcetona **50** con un alto rendimiento.

2) Arilcetonas con 1, 2 o 3 átomos de halógeno (cloro o flúor):

Los derivados 2-clorobencil-, 2,3-diclorobencil-, 3-cloro-2-fluorobencil- y 2,3,6-trifluorobencilcetona **51** - **55** fueron obtenidos de la reacción de **1** con los cloruros de 2-clorobenzoilo, 2,3-diclorobenzoilo, 2,3-difluorobenzoilo, 3-cloro-2-fluorobenzoilo y 2,3,6-trifluorobenzoilo, respectivamente, con buenos rendimientos (Esquema 14).



Esquema 14. Síntesis de las arilcetonas halogenadas.

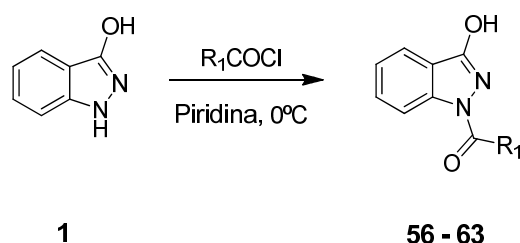
3) Alquil, fenil, alcoxifenil y heteroarilcetonas:

Las alquilfenilcetonas, 4-metilbencil- **56** y 2,4,6-trimetilbencilcetona **57**, y la 4-fenilbencilcetona **58** se sintetizaron mediante la reacción del 1H-3-indazolol **1** con los cloruros de 4-metilbenzoilo, 2,4,6-trimetilbenzoilo y 4-fenilbenzoilo respectivamente.

Las alcoxifenilcetonas 2-benciloxibencil- **59**, 4-metoxibencil- **60** y 3,4,5-trimetoxibencilcetona **61** se prepararon a partir de **1** y los cloruros de 2-benciloxibenzoilo, 4-metoxibenzoilo y 3,4,5-trimetoxibenzoilo (Esquema 15).

Por otro lado, se sintetizaron las heteroarilcetonas 2-tienilcetona **62** y 4-cloro-3-piridilcetona **63** mediante reacción de **1** con los cloruros de 2-tienilcarbonilo y 4-cloro-3-piridilcarbonilo.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en condiciones de reacción similares a las anteriores. En general, los derivados se prepararon con buenos rendimientos.



	R ₁
56	4-MePh
57	2,4,6-triMePh
58	4-BiPh
59	2-BnOPh
60	4-MeOPh
61	3,4,5-triMeOPh
62	2-tienilo
63	4-Cl-3-py

Esquema 15. Síntesis de las alquil, fenil, alcoxifenil y heteroarilcetonas.

4.2.2. Preparación de derivados carbonílicos de 3-dialquilaminoalcoxi-1-indazolilo

Una vez obtenidas las 3-hidroxiindazolilcetonas **14** - **45** se procedió a la formación de los éteres correspondientes (III) siguiendo la ruta **A** descrita en el esquema 11.

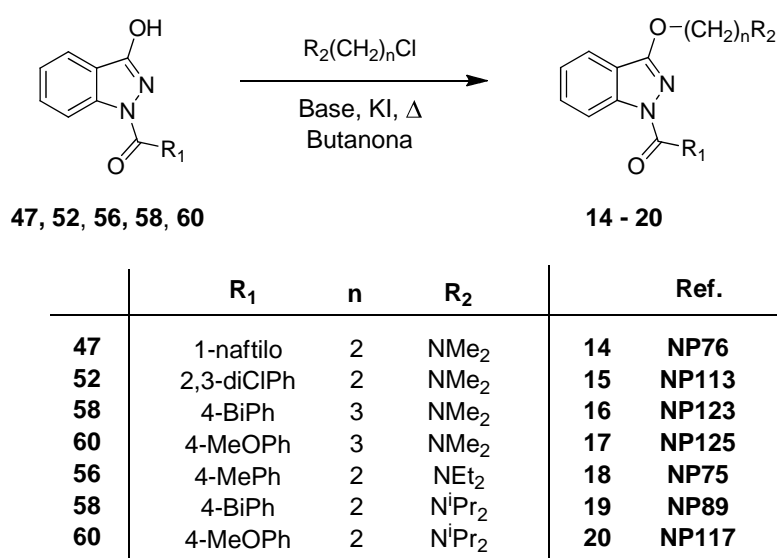
Las condiciones de esta reacción fueron puestas a punto probando diferentes disolventes tales como acetona, butanona, etanol, dicloroetano, agua, tolueno, 1,4-dioxano, acetonitrilo y THF; siendo la acetona y la butanona las que mostraron mejores rendimientos. Finalmente se eligió la butanona por tener un punto de ebullición mayor, ya que permitía utilizar temperaturas de reacción más altas, lo que acortaba el tiempo de reacción.

Para seleccionar la base, se probaron tanto K_2CO_3 como Cs_2CO_3 pero no se observaron diferencias significativas en cuanto a tiempo y rendimiento de la reacción, por lo que se utilizan ambas bases.

Los derivados de 3-(dialquilaminoalcoxi)indazolilcetona obtenidos se han clasificado en tres grupos en función del grupo amino del haluro utilizado:

1) Dialquilaminoalcoxiindazoles:

La reacción de 1-naftil- **47** y 2,3-diclorofenilcetona **52** con el hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)dimetilamino y, por otro lado, 4-metilfenilcetona **56** con el hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)diethylamino dio lugar a las dimetilaminoetoxiindazolilcetonas **14** (NP76) y **15** (NP113) por un lado, y a la dietilaminoetoxiindazolilcetona **18** (NP75) por otro lado (Esquema 16).



Esquema 16. Síntesis de los dialquilaminoalcoxiindazoles.

De igual manera, la preparación de las diisopropilaminoetoxiindazolilcetonas **19** (NP89) y **20** (NP117) se llevó a cabo a partir de los compuestos 4-bifenilil- **58** y 4-metoxifenilcetona **60** con el hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)diisopropilamino, respectivamente.

Todos los derivados descritos en este grupo presentan una amina terciaria lineal con cadenas de dos eslabones, pero además se prepararon dos compuestos con la cadena más larga. Estos son las dimetilaminopropoxiindazolilcetonas **16** (NP123) y **17** (NP125), que surgieron de la reacción de 4-bifenilil- **58** y 4-metoxifenilcetona **60** con el hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)dimetilamino.

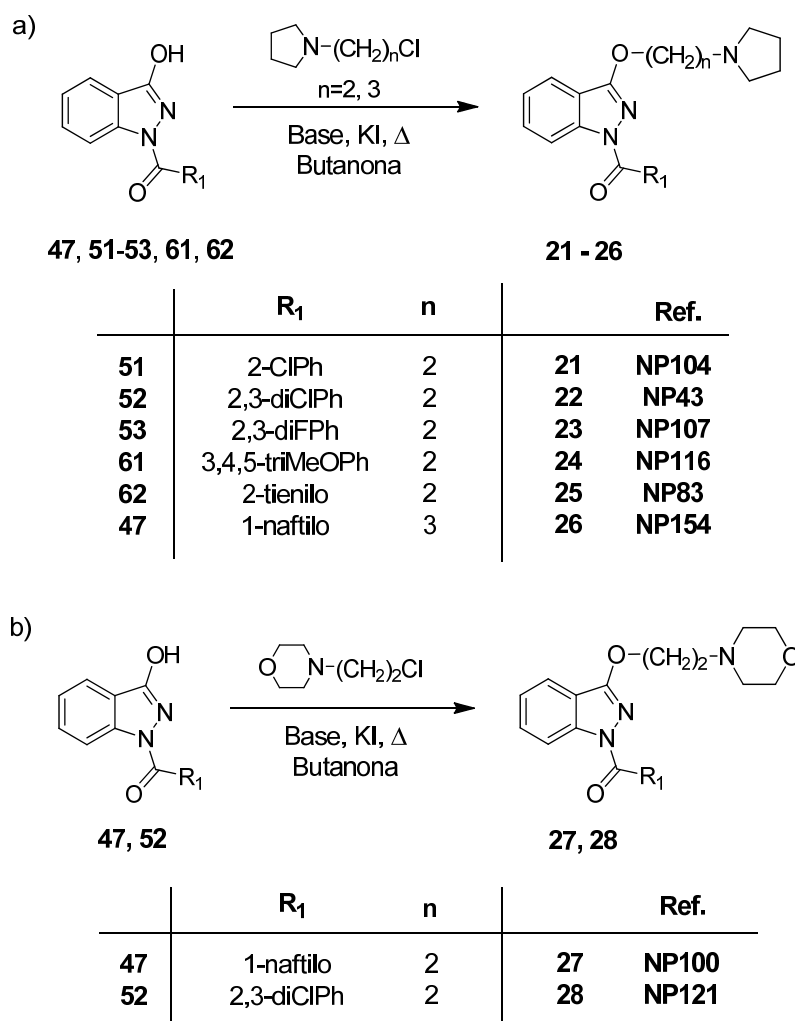
2) Pirrolidinil- y morfolinoalcoxiindazoles:

Además de las aminas lineales del grupo anterior, se utilizaron aminas cíclicas como la pirrolidina y la morfolina.

Así, mediante los alcoxiderivados 2-clorofenil- **51**, 2,3-diclorofenil- **52**, 2,3-difluorofenil- **53**, 3,4,5-trimetoxifenil- **61**, 2-tienil- **62** y 1-naftilcetona **47** y los hidroccloruros de 1-(2-cloroetil)pirrolidino y hidroccloruro de 1-(3-cloropropil)pirrolidino y se pudieron obtener las pirrolidiniletoxiindazolicetonas **21** (NP104), **22** (NP43), **23** (NP107), **24** (NP116) y **25** (NP83) y la pirrolidinilpropoxiindazolicetona **26** (NP154) (Esquema 17).

En el caso del compuesto **26** (NP154) fue necesario preparar el cloruro puesto que no era comercial. Así, el cloruro de 1-(3-cloropropil)pirrolidina se preparó por reacción de pirrolidina con 1-bromo-3-cloropropano y K_2CO_3 en diclorometano a temperatura ambiente durante 18h, tal y como viene descrito en la bibliografía¹²³. El producto final se obtuvo con un rendimiento del 4%.

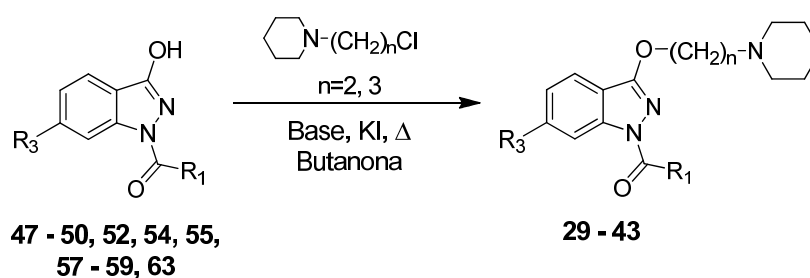
Por otro lado, se empleó el hidroccloruro de 1-(2-cloroetil)morfolino para preparar las morfolinoetoxiindazolicetonas **27** (NP100) y **28** (NP121) partiendo de los derivados intermedios 1-naftil- **47** y 2,3-diclorofenilcetona **52**, respectivamente (Esquema 17).



Esquema 17. Síntesis de los a) pirrolidinilalcoxiindazoles y b) morfolinoalcoxiindazoles.

3) Piperidinoalcoxiindazoles:

Las piperidinetoxiindazolilcetonas **29** (NP152), **30** (NP73), **31** (NP93), **32** (NP101), **33** (NP111), **34** (NP91) y **35** (NP94) se obtuvieron por reacción del hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)piperidino con 1-naftil- **47**, 2-naftil- **49**, 1-adamantil- **50**, 2,3-diclorofenil- **52**, 2,3,6-trifluorofenil- **55**, 2,4,6-trimetilfenil- **57** y 4-cloro-3-piridilcetona **63**, respectivamente (Esquema 18).



	R ₁	R ₃	n	Ref.	
47	1-naftilo	H	2	29	NP152
49	2-naftilo	H	2	30	NP73
50	adamantilo	H	2	31	NP93
52	2,3-diClPh	H	2	32	NP101
55	2,3,6-triFPh	H	2	33	NP111
57	2,4,6-triMePh	H	2	34	NP91
63	4-Cl-3-py	H	2	35	NP94
47	1-naftilo	H	3	36	NP124
48	1-naftilo	6-Cl	3	37	NP145
49	2-naftilo	H	3	38	NP153
58	4-BiPh	H	3	39	NP174
52	2,3-diClPh	H	3	40	NP120
54	3-Cl-2-FPh	H	3	41	NP129
57	2,4,6-triMePh	H	3	42	NP128
59	2-BnOPh	H	3	43	NP148

Esquema 18. Síntesis de los piperidinoalcoxiindazoles.

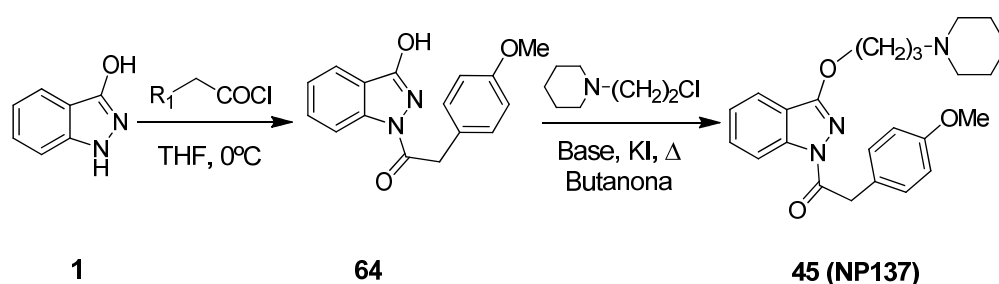
Además, se elaboraron piperidinoalcoxiindazoles con los intermedios 1-naftil- **47**, 6-cloro-1-naftil- **48**, 2-naftil- **49**, 4-bifenilil- **58**, 2,3-diclorofenil- **52**, 3-cloro-2-fluorofenil- **54**, 2,4,6-trimetilfenil- **57** y 2-benciloxifenilcetona **59**; e hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidino dando lugar a las piperidinopropoxiindazolilcetonas **36** (NP124), **37** (NP145), **38** (NP153), **39** (NP174), **40** (NP120), **41** (NP129), **42** (NP128) y **43** (NP148).

4.2.3. Preparación de bencilindazolilcetonas.

Para tener una mayor variación estructural en la posición 1 del 3-indazolol, se decidió preparar derivados de bencilcetonas que separaran en un eslabón el grupo carbonilo y el fenilo, de manera que éste aportara menos rigidez en esta parte de la estructura y permitiera una mejor interacción con las dianas.

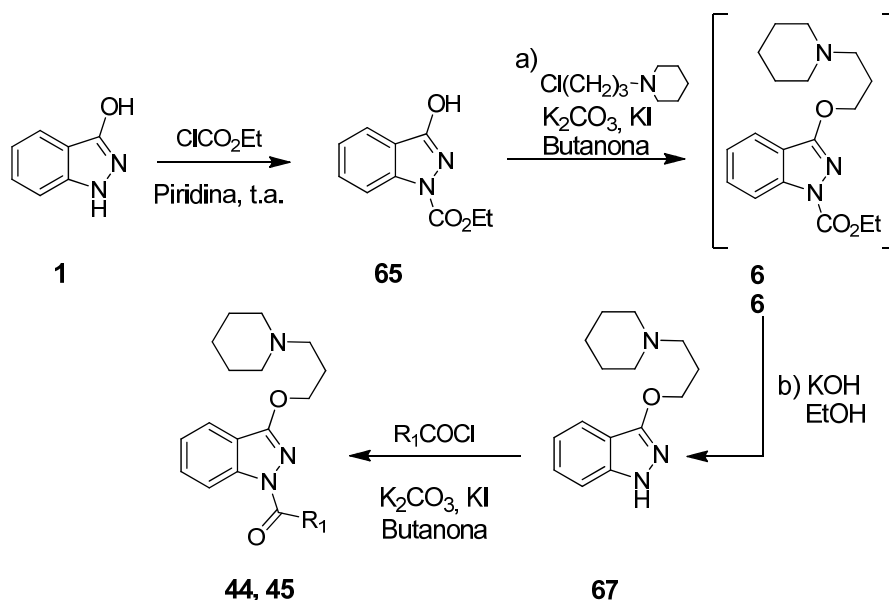
En primer lugar, la 4-metoxibencilcetona **64** se sintetizó siguiendo la ruta **A**, a partir de **1** y el cloruro de 2-(4-metoxifenil)acetilo (Esquema 19). En esta reacción, utilizando las mismas condiciones que las indicadas anteriormente, se obtenía una mezcla compleja difícil de purificar. Por ello, se decidió cambiar las condiciones de reacción utilizando tetrahidrofurano (THF) pudiendo observarse tras 3h el producto con un rendimiento medio-alto.

Una vez preparada la bencilcetona **64** se procedió a la preparación de la correspondiente (piperidinopropoxilindazolil)(bencil)cetona **45** (**NP137**), a partir del hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, con un bajo rendimiento (Esquema 19).



Esquema 19. Procedimiento sintético para la preparación de los 1-fenilacetil-3-piperidino alcoxiindazoles (ruta A).

En vista del bajo rendimiento obtenido en el último paso de reacción (11 %), se decidió explorar el procedimiento alternativo de acuerdo a la ruta **B** (Esquema 20) para la preparación de los compuestos **44** (**NP132**) y **45** (**NP137**).



	Ref.	R_1
44	NP132	4-ClBn
45	NP137	4-MeOBn

Esquema 20. Procedimiento sintético para la preparación de los compuestos **44** (**NP132**) y **45** (**NP137**) (ruta B).

En primer lugar, se protegió la posición N1 de **1** con cloroformiato de etilo en piridina a temperatura ambiente¹¹⁵, formando el 1-etoxicarbonil-3-indazolol **65**. Posteriormente, **65** se hizo reaccionar con el hidrocloreuro de la 1-(3-cloropropil)piperidina para obtener el derivado **66**, que no se aisló y cuya desprotección con KOH/EtOH, condujo al 3-piperidinopropoxi-1*H*-indazol **67** (Esquema 20).

Finalmente, se obtuvieron las (piperidinopropoxilindazolil)(bencil)cetonas **44** (NP132) y **45** (NP137) mediante la reacción con los hidrocloreuros de 2-(4-clorofenil)acetilo o 2-(4-metoxifenil)acetilo, respectivamente.

Desgraciadamente el rendimiento global obtenido para la preparación del derivado **45** (NP137) fue menor que el correspondiente utilizando la ruta A (Esquema 19).

4.3. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

Las estructuras de todos los compuestos sintetizados han sido establecidas de acuerdo con los datos analíticos y espectroscópicos de ¹H-RMN y ¹³C-RMN y mediante análisis de HPLC-MS. Todos estos de caracterización se encuentran recogidos en la parte experimental.

El análisis por RMN de las 3-hidroxiindazolilcetonas se ha realizado en DMSO, mientras que para los productos finales **14** - **45** se ha empleado CDCl₃. La asignación de las señales correspondientes a los carbonos e hidrógenos del esqueleto del sistema de indazol se ha realizado en base a los desplazamientos químicos y a la influencia del sustituyente existente en la posición 6 del anillo aromático del indazol.

Todas las indazolilcetonas muestran los desplazamientos de los cuatro hidrógenos del esqueleto de indazol más altos que los del 1*H*-3-indazolol **1** sin sustituir. Dentro de las indazolilcetonas, la mayoría de las N1,O3-disustituidas muestran señales más desapantalladas que las N1-sustituidas.

En los derivados N1,O3-disustituidos, los sustituyentes parecen tener mayor influencia en el 4-H y en el grupo OH, puesto que los desplazamientos oscilan entre 8,60 y 7,59 ppm y 12,97 y 9,95 ppm, respectivamente; mientras que, para el resto de protones, el intervalo de desplazamientos apenas varía en 0,5 ppm, siendo para 5-H de 7,78 - 7,22 ppm, para 6-H de 7,45 - 7,04 ppm y para 7-H de 7,99 - 7,34 ppm (Figura 16).

En este caso la longitud de la cadena alquílica y el tipo de grupo en R₂ no afectan de manera notable al apantallamiento y desapantallamiento de los hidrógenos del indazol.

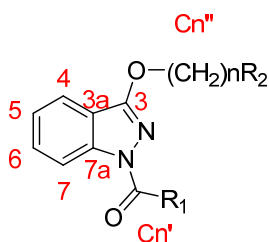


Figura 16. Numeración de los carbonos de la estructura de las indazolilcetonas.

Si ahora se analizan las señales de los carbonos del indazol, la señal más desapantallada corresponde al C-3, precisamente debido a la influencia de los heteroátomos que rodean esta posición. Al igual que sucedía con las señales de los hidrógenos, las señales de los carbonos del esqueleto de todos los compuestos preparados se encuentran más desapantalladas en comparación con el 1*H*-3-indazolol **1**. Así bien, el carbono sobre el que mayor influencia ejercen los diferentes tipos de sustituyentes es el C-3 cuyos valores oscilan entre 161 y 140 ppm. Los demás carbonos presentan menos variabilidad, de manera que C-7a está entre 142 y 134 ppm, C-5 entre 135 y 126 ppm, C-6 entre 127 y 120 ppm, C-4 entre 117 y 110 ppm, C-7 entre 120 y 118 ppm, y C-3a entre 119 y 112 ppm (Figura 16).

Por otro lado, ha sido necesario el análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear para obtener la confirmación de que en todos los casos se ha obtenido el isómero afirmado anteriormente. Así, en el caso de las indazolilcetonas **14** - **45**, los desplazamientos del C-1'' oscilan entre 63,4 y 69,2 ppm. Si se atiende a la literatura, para la (3-dimetilaminopropoxiindazolil)(1-fenil)cetona¹¹⁷, el desplazamiento es de 67,2 ppm. Además, el valor teórico del C-1'' es 68,1 ppm, mientras que para un posible derivado N2-sustituido es 43,3 ppm¹²⁴. Por ello, se puede afirmar que se trata de derivados N1,O3-disustituídos.

Tras comprobar que los desplazamientos observados se corresponden con el N1,O3-disustituido, se puede conocer en qué nitrógeno se encuentra el grupo acetilo en las fenilcetonas mediante comparación del desplazamiento del C-1' con su compuesto homólogo disustituido. De esta manera, analizando los datos se observa como hay una diferencia media de $\pm 2,09$ ppm, por lo que se puede afirmar que la reacción de acilación en piridina a 0°C da lugar a los derivados N1-sustituídos (Figura 16).

5. FARMACOLOGÍA

5.1. FARMACOLOGÍA

Para conocer el perfil farmacológico de los derivados carbonílicos de indazolilo presentados en este proyecto (14-45), se han realizado una serie de estudios biológicos para establecer su efecto en los diferentes sistemas biológicos objetivo del estudio, como son las enzimas BuChE y BACE-1 y el receptor CB2.

Los criterios utilizados, que se encuentran esquematizados en la figura 17, recogen los diferentes ensayos realizados para determinar la actividad colinérgica, la capacidad de inhibir la enzima β -secretasa-1 y el efecto cannabinoide, de acuerdo con los objetivos marcados.

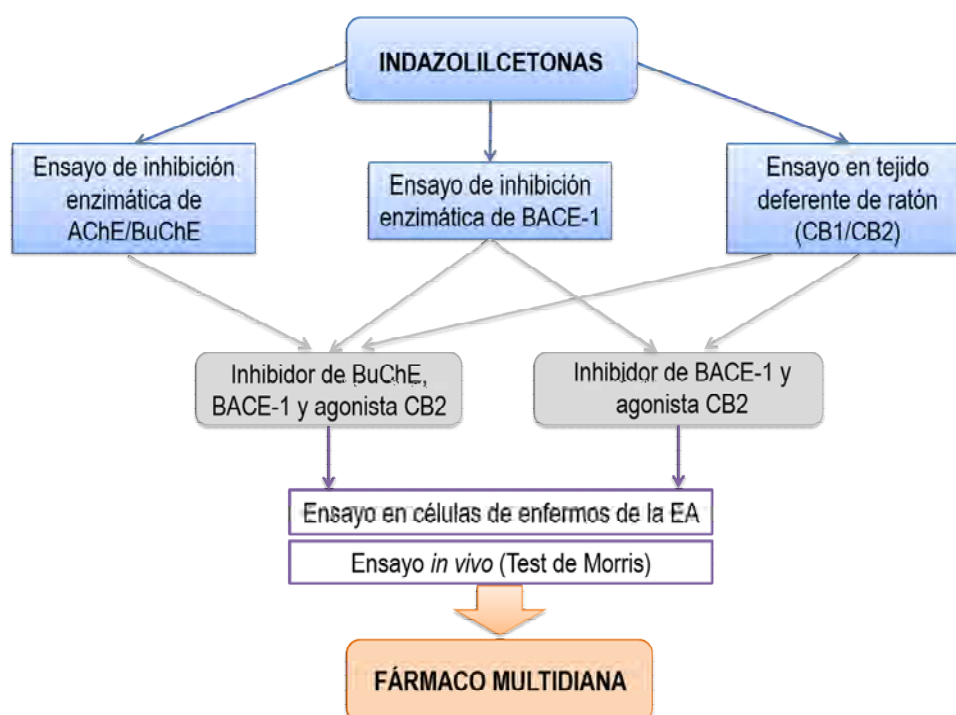


Figura 17. Metodología para el estudio farmacológico en el desarrollo de fármacos multidiana.

En primer lugar, se realizaron ensayos para determinar la capacidad de inhibición de las enzimas acetil- (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) de todos los compuestos obtenidos. Los derivados que mostraron un efecto interesante de inhibición de la enzima BuChE fueron evaluados para determinar el mecanismo de acción mediante ensayos de competición, comprobando de esta manera si se trataba de un comportamiento competitivo, no competitivo o mixto.

Por otra parte, se llevaron a cabo estudios para determinar la capacidad de inhibición de la β -secretasa-1.

Finalmente, se realizaron estudios en tejido para determinar el efecto cannabinoide como agonistas de los receptores CB2.

Los resultados obtenidos fueron analizados de acuerdo a una serie de criterios enfocados al descubrimiento de nuevos fármacos multidiana (CB2/BuChE/BACE-1).

Así, los compuestos más interesantes fueron evaluados en un ensayo *in vitro* con células de enfermos de Alzheimer que permite estudiar la viabilidad celular y el efecto neuroprotector.

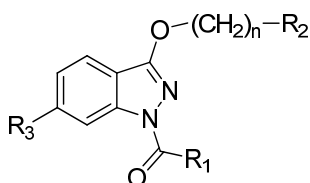
Por último, se realizó un estudio *in vivo* en un modelo de la enfermedad de Alzheimer en ratones que tienen sobreexpresado el péptido β -amiloide humano.

5.2. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LAS ENZIMAS AChE Y BuChE

Los estudios de inhibición enzimática se realizaron en el Instituto de Química Médica por la Dra. Concepción Pérez. Todos los derivados carbonílicos de indazolilo preparados **14-45** fueron ensayados para determinar el efecto colinérgico en las enzimas AChE y BuChE de suero humano, utilizando el procedimiento descrito por *Ellman y col.*¹²⁵.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 4, en donde se muestran los valores de IC_{50} de AChE/BuChE utilizando como referencia uno de los compuestos más interesantes de la serie de la familia de éteres de indazol, el **PGN33**, y los fármacos de referencia donepezilo y rivastigmina.

Tabla 4. Datos de IC_{50} de los compuestos estudiados **14 - 45** frente a las enzimas hAChE y hBuChE.



Compuesto	R ₁	R ₂	n	R ₃	IC ₅₀ hAChE (μM)	IC ₅₀ hBuChE (μM)	Inh. BuChE	
PGN33					>10 (24%) ^a	4,8 ± 0,3	ND ^d	
donepezilo					10 ± 2 μM	2,50 ± 0,07 ^b	M ^e	
rivastigmina					48 ^c	54 ^c	ND ^d	
14	NP76	1-naftilo	NMe ₂	2	H	>10 (39%) ^a	2,00 ± 0,2	ND ^d
15	NP113	2,3-diClPh	NMe ₂	2	H	11,2 ± 0,7	10,7 ± 0,5	ND ^d
16	NP123	4-biPh	NMe ₂	3	H	>10	8,7 ± 0,3	ND ^d
17	NP125	4-MeOPh	NMe ₂	3	H	9,4 ± 0,4	>10 (40%) ^a	ND ^d
18	NP75	<i>p</i> -tolilo	NEt ₂	2	H	>10 (37%) ^a	>10 (33%) ^a	ND ^d
19	NP89	4-biPh	N ⁱ Pr ₂	2	H	>10 (49%) ^a	>10 (32%) ^a	ND ^d
20	NP117	4-MeOPh	N ⁱ Pr ₂	2	H	8 ± 1	3,7 ± 0,4	ND ^d
21	NP104	2-ClPh	1-pirrolidinilo	2	H	9,7 ± 0,8	1,3 ± 0,5	ND ^d
22	NP43	2,3-diClPh	1-pirrolidinilo	2	H	>10	0,23 ± 0,02	M ^e
23	NP107	2,3-diFPh	1-pirrolidinilo	2	H	11 ± 1	11 ± 1	ND ^d
24	NP116	3,4,5-triMeOPh	1-pirrolidinilo	2	H	11,6 ± 0,5	>10	ND ^d

Compuesto	R ₁	R ₂	n	R ₃	IC ₅₀ hAChE (μM)	IC ₅₀ hBuChE (μM)	Inh. BuChE
25 NP83	2-tienilo	1-pirrolidinilo	2	H	12,1 ± 0,7	6,6 ± 0,6	ND ^d
26 NP154	1-naftilo	1-pirrolidinilo	3	H	>10 (35%) ^a	0,15 ± 0,03 nM	M ^e
27 NP100	1-naftilo	morfolino	2	H	12 ± 1	5,1 ± 0,3	ND ^d
28 NP121	2,3-diClPh	morfolino	2	H	7,8 ± 0,9	>10 (26%) ^a	ND ^d
29 NP152	1-naftilo	piperidino	2	H	>10 (37%) ^a	0,26 ± 0,07 nM	M ^e
30 NP73	2-naftilo	piperidino	2	H	>10 (43%) ^a	4,0 ± 0,3	C ^f
31 NP93	adamantilo	piperidino	2	H	8 ± 1	2 ± 1	ND ^d
32 NP101	2,3-diClPh	piperidino	2	H	10,5 ± 0,5	0,6 ± 0,3	ND ^d
33 NP111	2,3,6-triFPh	piperidino	2	H	9,4 ± 0,6	9,4 ± 0,3	ND ^d
34 NP91	2,4,6-triMePh	piperidino	2	H	11,6 ± 0,7	0,29 ± 0,03	ND ^d
35 NP94	4-Cl-3-Py	piperidino	2	H	13 ± 1	14,7 ± 0,9	ND ^d
36 NP124	1-naftilo	piperidino	3	H	>10 (43%) ^a	0,07 ± 0,01 nM	M ^e
37 NP145	1-naftilo	piperidino	3	6-Cl	>10 (41%) ^a	6 ± 1 nM	M ^e
38 NP153	2-naftilo	piperidino	3	H	>10 (33%) ^a	2,1 ± 0,3	M ^e
39 NP174	4-biPh	piperidino	3	H	>10 (38%) ^a	2,5 ± 0,9	ND ^d
40 NP120	2,3-dClPh	piperidino	3	H	17 ± 2	0,080 ± 0,003	M ^e
41 NP129	3-Cl-2-FPh	piperidino	3	H	>10 (48%) ^a	0,80 ± 0,04	M ^e
42 NP128	2,4,6-triMePh	piperidino	3	H	>10	0,58 ± 0,06	M ^e
43 NP148	2-BnOPh	piperidino	3	H	>10 (31%) ^a	3 ± 1 nM	M ^e
44 NP132	4-ClBn	piperidino	3	H	>10 (43%) ^a	>10 (46%) ^a	ND ^d
45 NP137	4-MeOBn	piperidino	3	H	>10 (43%) ^a	>10 (42%) ^a	ND ^d

^a Porcentaje de inhibición a 10 μM; ^b IC₅₀ experimental en BuChE de suero equino; ^c Referencia¹²⁶; ^d ND: No determinado; ^e M: Mixto; ^f C: Competitivo

En relación a los ensayos en la enzima AChE, hay que señalar que no fue posible la determinación de la IC₅₀ para algunos de los derivados evaluados por razones de solubilidad. Como se puede observar en la tabla 4, los valores de IC₅₀ demuestran que la mayoría de los compuestos ensayados presentan cierta capacidad de inhibir a la enzima AChE (IC₅₀= 8-17 μM),

Analizando los resultados que se recogen en esta tabla puede observarse como todos los compuestos preparados en los que fue posible determinar la IC₅₀ inhiben a la enzima BuChE al menos en el orden del compuesto de referencia **PGN133**. No obstante, hay que destacar entre todos ellos, una serie de derivados que se comportan como inhibidores de la enzima BuChE en el orden nanomolar como **36 (NP124)**, **26 (NP154)**, **29 (NP152)**, **43 (NP148)**, **37 (NP145)** con valores de IC₅₀ entre 0,07 a 6,0.

Analizando la tabla se pueden sacar algunas conclusiones que parecen clave para la inhibición de la enzima BuChE.

En cuanto a la posición R_1 , parece muy claro que la presencia de un grupo 1-naftilo (**36**; **NP124**) mejora cualitativamente la de las indazolilcetonas como inhibidores de la enzima BuChE. Respecto a otros sustituyentes en posición 1, cabe mencionar al 2,3-diclorofenilo (**40**; **NP120**) o al 2-benciloxifenilo (**43**; **NP148**) que muestran una mayor capacidad de inhibición que **PGN33**.

En cuanto al sustituyente R_2 , la IC_{50} es menor cuando la amina es piperidina o pirrolidina. Así sucede, entre otros, con la 2,3-diclorofenilcetona si se comparan los compuestos **15** (**NP113**) y **28** (**NP121**), donde R_2 es dimetilamina y morfolina respectivamente, y los derivados pirrolidinil **22** (**NP43**) y piperidino **32** (**NP101**).

De acuerdo con la longitud de la cadena alquílica, no hay suficientes datos como para determinar una conclusión clara de la influencia de este factor en la respuesta en la inhibición de la enzima BuChE. Si parece que ésta es mejor cuando $n=3$ para aquellos derivados que presentan en R_1 un grupo 2,3-diclorofenilo (**28**; **NP101** vs **32**; **NP120**), 1-piperidino (**29**; **NP152** vs **36**; **NP124**) o 2-naftilo (**30**; **NP73** vs **38**; **NP153**). En cambio, con las 2,4,6-trimetilcetonas (**34**; **NP91** vs **40**; **NP128**) sucede todo lo contrario.

Finalmente, señalar que la sustitución de un cloro en posición 6 no favorece la inhibición de la enzima BuChE, tal y como se observa al comparar **36** (**NP124**) con **37** (**NP145**).

5.3. ENSAYO DE COMPETICIÓN ENZIMÁTICA

Una vez obtenidos los datos de inhibición enzimática, se realizaron ensayos de competición para estudiar el tipo de inhibición de la enzima butirilcolinesterasa.

Los inhibidores enzimáticos se pueden clasificar en competitivos, no competitivos y mixtos, dependiendo del sitio de unión del compuesto al centro activo de la enzima (Figura 18).

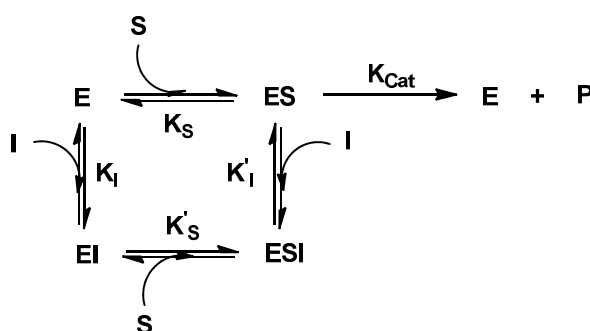


Figura 18. Esquema representativo de los tipos de inhibición enzimática.

Cuando se trata de un inhibidor competitivo, éste va a interaccionar con los aminoácidos del centro activo de la enzima impidiendo que lo haga el sustrato natural. De esta manera inhibidor y sustrato están compitiendo por el mismo sitio de unión.

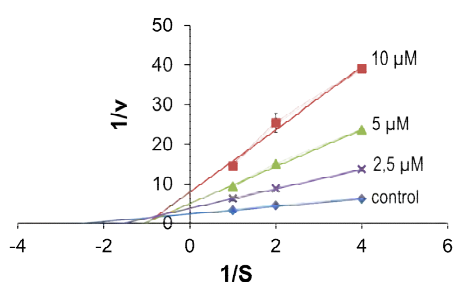
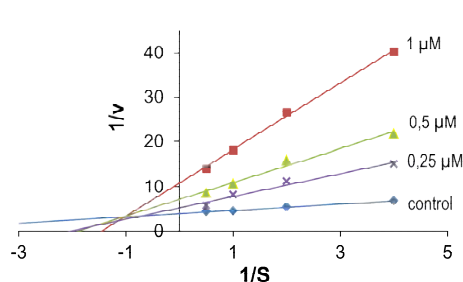
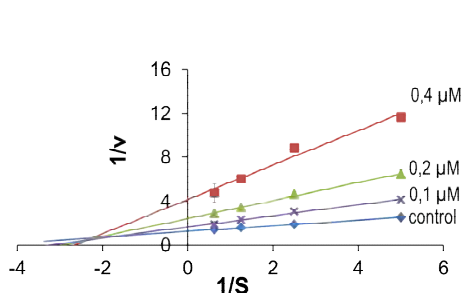
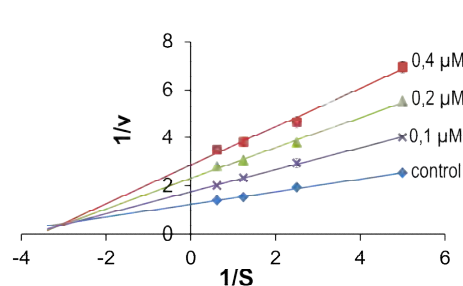
En el caso de un inhibidor no competitivo, éste se va a unir a un centro alostérico de la enzima, es decir, a una posición distinta del sitio activo, de manera que el sustrato puede continuar con su proceso natural de unión a la enzima. Este tipo de inhibidor va a interactuar con la misma afinidad tanto con la enzima libre como con el complejo enzima-sustrato, generando en ambos casos un complejo catalíticamente inactivo.

Un inhibidor de tipo mixto es similar al inhibidor no competitivo, con la diferencia de que la afinidad por la enzima libre y por el complejo enzima-sustrato es diferente. En este caso, el inhibidor se va a unir al centro alostérico de la enzima, pero dependiendo de su estructura y disposición va a dificultar la interacción del sustrato natural con el centro activo.

Las enzimas colinérgicas, como se ha comentado en el primer capítulo, están formadas por el centro activo CAS y el sitio periférico PAS. Si trasladamos los fundamentos teóricos de los diferentes tipos de inhibición a este caso concreto, el inhibidor competitivo va a competir con la acetilcolina o butirilcolina por el centro activo y, tanto el inhibidor no competitivo como el mixto, van a interactuar con el PAS, de manera que el primero va a inactivar a la enzima con o sin sustrato por modificaciones alostéricas en la conformación de la misma; y el segundo va a dificultar y en algunos casos bloquear la entrada del sustrato hasta el CAS.

Para conocer el comportamiento de las indazolilcetonas, se llevó a cabo un estudio de las cinéticas de todos los compuestos que mostraron una IC_{50} en la enzima BuChE menor de $0,23 \mu M$ (**22**; **NP43**). Adicionalmente, se estudiaron algunos derivados estructuralmente diferentes como las 2-naftilcetonas **30** (**NP73**) y **38** (**NP153**), la trimetilfenilcetona **42** (**NP128**) y la 3-cloro-2-fluorofenilcetona **41** (**NP129**) (Figura 19).

Donepezilo:

**22 (NP43):****26 (NP154):****29 (NP152):**

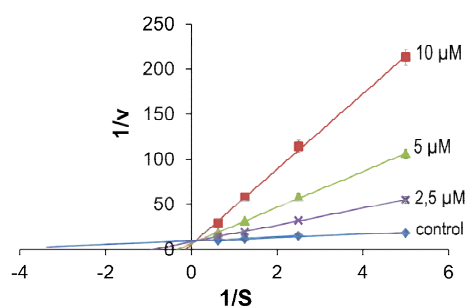
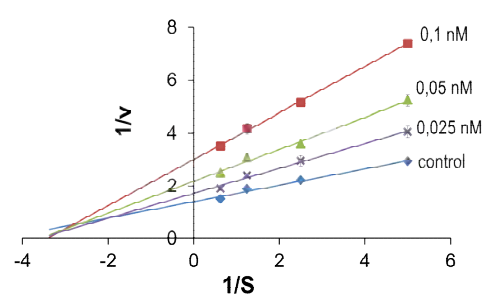
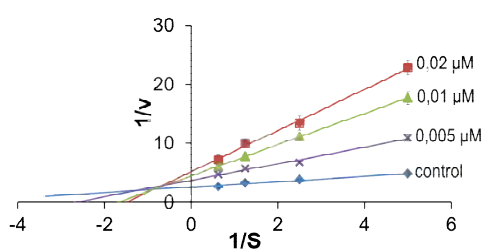
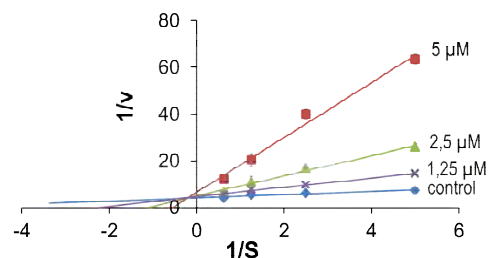
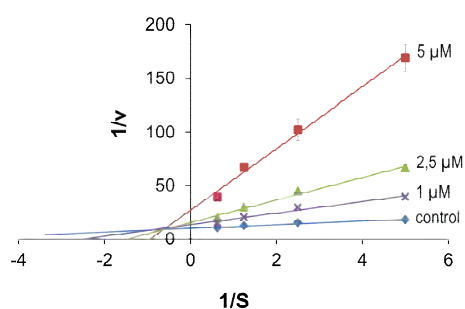
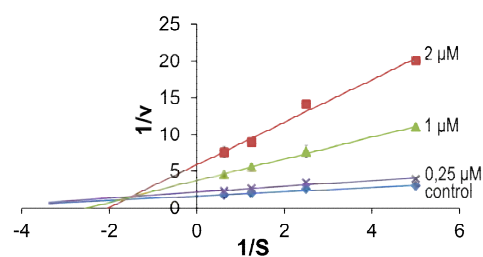
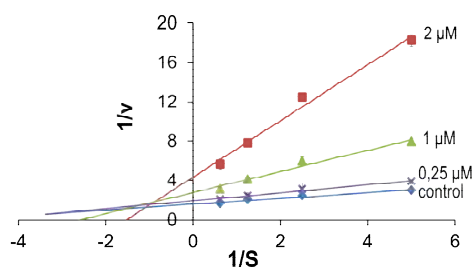
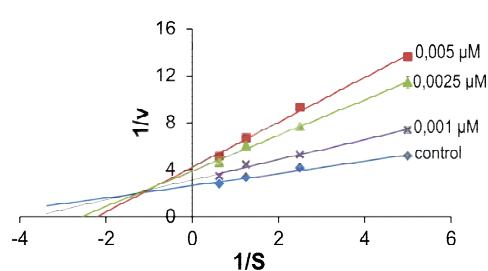
30 (NP73):**36 (NP124):****37 (NP145):****38 (NP153):****40 (NP120):****41 (NP129):****42 (NP128):****43 (NP148):**

Figura 19. Representación gráfica de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima BuChE de donepezilo y los compuestos 26 (NP154), 29 (NP152), 30 (NP73), 36 (NP124), 37 (NP145), 38 (NP153), 39 (NP174), 40 (NP120), 41 (NP129), 42 (NP128) y 43 (NP148).

Para clarificar el tipo de inhibición de los compuestos, se han representado los datos con la representación de Lineweaver-Burk. En este tipo de gráfica se representa el inverso de la velocidad frente al inverso de la concentración de sustrato, de forma que cuando las rectas se cruzan en el eje de ordenadas, se trata de una inhibición competitiva; cuando lo hacen en el eje de abscisas, el compuesto se comporta de un modo no competitivo; y cuando lo hacen en el cuadrante, es un inhibidor de tipo mixto.

Atendiendo al perfil de las gráficas, en todos los casos se produce un aumento de la pendiente a medida que aumenta la concentración de inhibidor.

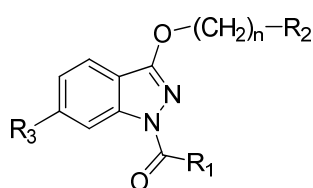
El fármaco de referencia donepezilo presenta un comportamiento de tipo mixto, ya que las rectas se cruzan en el cuadrante y no en los ejes, lo cual reafirma los resultados publicados en la literatura¹²⁷.

Al igual que donepezilo, todos los compuestos a excepción del derivado **30 (NP73)** se comportan como inhibidores de tipo mixto. En el compuesto **30 (NP73)**, la intersección de las rectas se produce en el eje de ordenadas, lo que implica que la inhibición es de tipo competitivo.

5.4. ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA BACE-1

Los estudios de inhibición enzimática en la enzima BACE-1 se realizaron en el Instituto de Química Médica por la Dra. Concepción Pérez. Todos los derivados carbonílicos de indazolino preparados **14-45** fueron ensayados para determinar la capacidad de inhibir a la enzima BACE-1, aplicando el protocolo de Invitrogen en el que se emplea un kit de ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)¹²⁸.

Tabla 5. Datos de la inhibición enzimática (% de inhibición a 10 μ M) de los compuestos **14-45**.



Compuesto	R ₁	R ₂	n	R ₃	BACE (% a 10 μ M)
14 NP76	1-naftilo	dimetilamino	2	H	25 \pm 1
15 NP113	2,3-diclorofenilo	dimetilamino	2	H	5,7 \pm 0,2
16 NP123	4-bifenililo	dimetilamino	3	H	57 \pm 2
17 NP125	4-metoxifenilo	dimetilamino	3	H	14 \pm 2
18 NP75	<i>p</i> -tolilo	dietilamino	2	H	16 \pm 5
19 NP89	4-bifenililo	diisopropilamino	2	H	61,0 \pm 0,9
20 NP117	4-metoxifenilo	diisopropilamino	2	H	19 \pm 3
21 NP104	2-clorofenilo	1-pirrolidinilo	2	H	9 \pm 3
22 NP43	2,3-diclorofenilo	1-pirrolidinilo	2	H	32,6 \pm 0,1

Compuesto	R ₁	R ₂	n	R ₃	BACE (% a 10 μ M)
23 NP107	2,3-difluorofenilo	1-pirrolidinilo	2	H	15 \pm 2
24 NP116	3,4,5-trimetoxifenilo	1-pirrolidinilo	2	H	6 \pm 4
25 NP83	2-tienilo	1-pirrolidinilo	2	H	8 \pm 5
26 NP154	1-naftilo	1-pirrolidinilo	3	H	20 \pm 4
27 NP100	1-naftilo	morfolino	2	H	26 \pm 4
28 NP121	2,3-diclorofenilo	morfolino	2	H	20 \pm 1
29 NP152	1-naftilo	piperidino	2	H	11 \pm 3
30 NP73	2-naftilo	piperidino	2	H	50 \pm 5
31 NP93	adamantilo	piperidino	2	H	25 \pm 4
32 NP101	2,3-diclorofenilo	piperidino	2	H	18,1 \pm 0,4
33 NP111	2,3,6-trifluorofenilo	piperidino	2	H	14,3 \pm 0,9
34 NP91	2,4,6-trimetilfenilo	piperidino	2	H	11 \pm 2
35 NP94	4-cloro-3-piridilo	piperidino	2	H	11 \pm 2
36 NP124	1-naftilo	piperidino	3	H	42 \pm 2
37 NP145	1-naftilo	piperidino	3	6-Cl	53 \pm 3
38 NP153	2-naftilo	piperidino	3	H	38 \pm 3
39 NP174	4-bifenililo	piperidino	3	H	93 \pm 2
40 NP120	2,3-diclorofenilo	piperidino	3	H	45,1 \pm 0,9
41 NP129	3-cloro-2-fluorofenilo	piperidino	3	H	34 \pm 1
42 NP128	2,4,6-trimetilfenilo	piperidino	3	H	45 \pm 4
43 NP148	2-benciloxifenilo	piperidino	3	H	38 \pm 1
44 NP132	4-clorobencilo	piperidino	3	H	50 \pm 2
45 NP137	4-metoxibencilo	piperidino	3	H	60 \pm 8

Los resultados obtenidos indican que muchos de los derivados sintetizados se comportan como inhibidores de la enzima BACE-1 en el rango micromolar.

Atendiendo al sustituyente R₁ de las indazolilcetonas, parece claro que la presencia del grupo 4-bifenilil favorece sustancialmente la capacidad de inhibición de la enzima BACE-1, **16 (NP123)**, **19 (NP89)** y **39 (NP174)**. Además, los sustituyentes que mejores resultados muestran son los grupos 2-naftil **30 (NP73)**, 2,3-diclorofenil **40 (NP120)**, 2,4,6-trimetilfenil **42 (NP128)**, 4-clorobencil **44 (NP132)** y 4-metoxibencil **45 (NP137)**; con valores superiores al 45%.

Si se analizan los resultados obtenidos según los sustituyentes en R₂, no se puede describir un claro patrón de actividad en los derivados con n=2. Así, las 1-naftilcetonas presentan un porcentaje de inhibición similar cuando R₂ es piperidino (**29, NP152**), dimetilamino (**14, NP76**) o morfolino (**27, NP100**). De la misma manera sucede con las 2,3-diclorofenilcetonas, apenas hay diferencias de actividad entre los sustituyentes piperidino (**32, NP101**), dimetilamino (**15, NP113**) o morfolino (**28, NP121**), únicamente existe una excepción con el 1-pirrolidinil (**22, NP43**), que se encuentra entorno al 30%.

En cambio, los derivados n=3 que contienen un grupo piperidino presentan una capacidad mayor de inhibición, como sucede en las 1-naftilcetonas (**26**, **NP154** vs **36**, **NP124**) y en las 4-bifenilicetonas (**16**, **NP123** vs **39**, **NP174**).

En cuanto a la cadena alquílica, en general, los derivados con n=3 son más potentes, llegando incluso a triplicar la actividad, que los que tienen n=2.

Este efecto se puede observar con claridad en las 1-naftilcetonas, **29** (**NP152**) y **36** (**NP124**); las 2,3-diclorofenilcetonas, **32** (**NP101**) y **40** (**NP120**); y las 2,4,6-timetilfenilcetonas, **34** (**NP91**) y **42** (**NP128**). En cambio, para las 2-naftilcetonas, **30** (**NP73**) y **38** (**NP153**); sucede todo lo contrario, el derivado con n=2 tiene mayor capacidad de inhibición que el n=3.

Finalmente, la incorporación de un cloro a la posición 6 del indazol aporta mayor actividad al compuesto si se compara con su homólogo (**36**, **NP124** vs **37**, **NP125**).

5.5. ESTUDIO DEL EFECTO CANNABINOIDE

Los estudios para la determinación del efecto cannabinoide de los compuestos sintetizados han sido realizados en la Facultad de Medicina de la Universidad Rey Juan Carlos por las doctoras M^a Isabel Martín-Fontelles y Rocío Girón Moreno mediante ensayos en tejido deferente de ratón.

El estudio de un compuesto en tejido aislado permite simplificar los estudios *in vivo* al eliminarse los factores de distribución, metabolismo y excreción. Estos ensayos contribuyen a la valoración de la funcionalidad del compuesto probado y, en particular, al establecimiento de sus propiedades agonistas o antagonistas. La caracterización *in vitro* de la actividad cannabinoide de los nuevos compuestos sintetizados se llevó a cabo mediante el ensayo típico para el estudio y la determinación del tipo de efecto cannabinoide, que consiste en la realización de ensayos de inhibición dosis-dependiente del efecto contráctil producido por estimulación eléctrica en conducto deferente de ratón. Los agonistas cannabinoides presentan la capacidad de inhibir las contracciones inducidas eléctricamente, probablemente producida por un efecto a nivel presináptico, reduciendo los niveles de ATP y disminuyendo la liberación de neurotransmisores que producen contracción de la musculatura lisa. Este efecto podría ser el resultado, a su vez, de la inhibición de flujos de Ca²⁺ producida por los cannabinoides. En cambio, los antagonistas son capaces de bloquear este efecto inhibitorio y los agonistas inversos producen el efecto contrario de aumento de la contracción^{51,129}.

La selección de los compuestos objeto de evaluación se realizó de acuerdo a los siguientes criterios:

- Una IC₅₀ de la enzima BuChE del orden nanomolar o menor de 1 µM, como son **22** (**NP43**), **26** (**NP154**), **29** (**NP152**), **32** (**NP101**); **34** (**NP91**), **36** (**NP124**), **37** (**NP145**); **40** (**NP120**); **41** (**NP129**); **42** (**NP128**) y **43** (**NP148**).

- Un porcentaje de inhibición en la enzima BACE-1 $\geq 45\%$, como son **16 (NP123)**, **19 (NP89)**, **30 (NP73)**, **37 (NP145)**, **39 (NP174)**, **42 (NP128)**, **44 (NP132)** y **45 (NP137)**.

En la Tabla 6 se muestra los datos obtenidos del estudio del efecto agonista de los derivados estudiados junto con el del compuesto de referencia el agonista WIN55212-2.

Tabla 6. Porcentajes del efecto inhibitorio en la respuesta contráctil para cada concentración de los compuestos **16, 19, 22, 26, 29, 30, 34, 36, 37, 39 - 45**.

Compuesto	R ₁	R ₂	n	R ₃	% (10 ⁻⁷ M)	% (3x10 ⁻⁷ M)	% (9x10 ⁻⁷ M)	% (2,7x10 ⁻⁶ M)	% (8,1x10 ⁻⁶ M)	% (1,82x10 ⁻⁵ M)
WIN55212-2					17,8	32,7	54,5	61,8	71,4	81,3
16 NP123	4-bifenililo	dimetilamino	3	H	-2,5	-2,8	-1,1	4,7	16,9	38,9
19 NP89	4-bifenililo	diisopropilamino	2	H	-5,1	-6,2	-5,5	-4,6	-8,3	-6,2
22 NP43	2,3-diclorofenilo	pirrolidinilo	2	H	1,6	5,6	17,3	27,8	56,3	80,8 ^a
26 NP154	1-naftilo	pirrolidinilo	3	H	-2,0	0,5	3,2	11,3	56,1	87,4
29 NP152	1-naftilo	piperidino	2	H	-0,7	1,4	8,6	28,6	69,2	93,7
30 NP73	2-naftilo	piperidino	2	H	0,3	-1,2	-3,5	-2,8	4,0	18,2
32 NP101	2,3-diclorofenilo	piperidino	2	H	1,3	3,8	15,6	29,4	80,5	87,2
34 NP91	2,4,6-trimetilfenilo	piperidino	2	H	2,6	3,6	6,5	14,0	30,7	56,8
36 NP124	1-naftilo	piperidino	3	H	1,1	3,4	7,4	16,4	34,1	56,2
37 NP145	1-naftilo	piperidino	3	6-Cl	-5,0	-3,2	-3,1	-8,3	-7,5	7,5
39 NP174	4-bifenililo	piperidino	3	H	-0,8	0,5	4,1	8,7	9,7	9,4
40 NP120	2,3-diclorofenilo	piperidino	3	H	1,4	6,2	14,3	27,4	89,3	96,6
41 NP129	3-cloro-2-fluorofenilo	piperidino	3	H	9,6	13,9	18,7	24,9	54,7	80,5
42 NP128	2,4,6-trimetilfenilo	piperidino	3	H	-3,3	-1,8	-2,3	-3,9	54,2	87,0
43 NP148	2-benciloxifenilo	piperidino	3	H	-12,5	-10,7	6,4	31,4	74,4	94,7
44 NP132	4-clorobencilo	piperidino	3	H	-4,5	-4,8	0,4	7,3	67,4	94,2
45 NP137	4-metoxibencilo	piperidino	3	H	-2,4	-0,3	16,9	42,5	88,5	96,0

^a % (2x10⁻⁵ M)

En la figura 20, se han representado aquellos derivados que han mostrado un efecto agonista igual o superior al del compuesto de referencia WIN55212-2, es decir con un perfil análogo al de un cannabinoide *full* agonista.

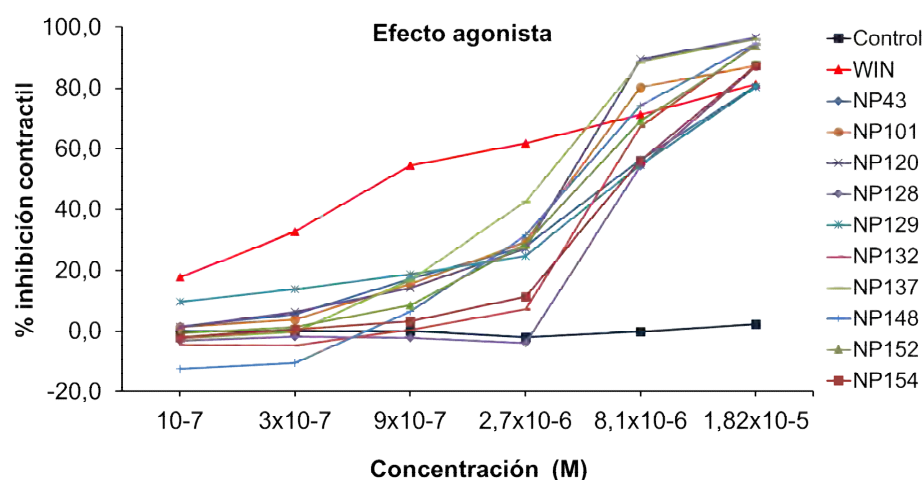


Figura 20. Efecto agonista de los derivados que presentan un efecto similar al WIN55212-2.

En la figura 21 se muestran los resultados obtenidos correspondientes a los derivados que mostraron un comportamiento análogo al de un agonista parcial.

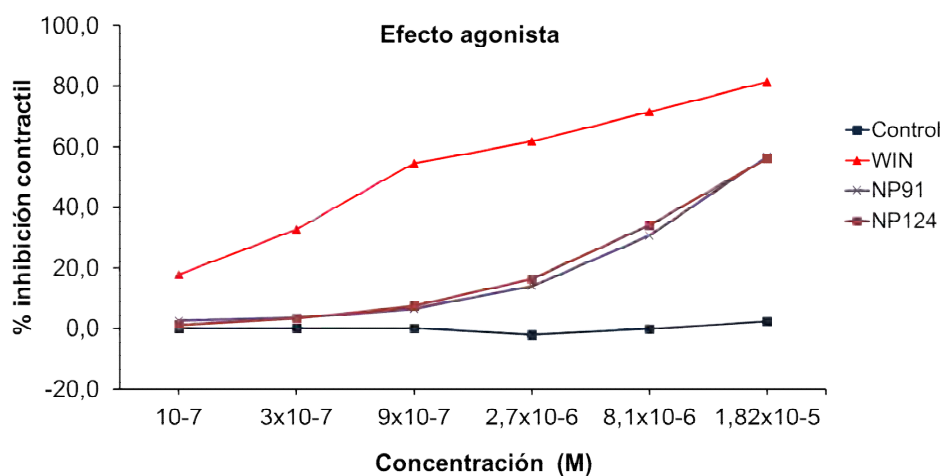


Figura 21. Representación gráfica de la respuesta inhibitoria de la contracción de los compuestos sintetizados **34** (NP91) y **36** (NP124); que presentan un efecto parcial.

Finalmente, en la figura 22 se muestran los compuestos evaluados que no muestran efecto agonista.

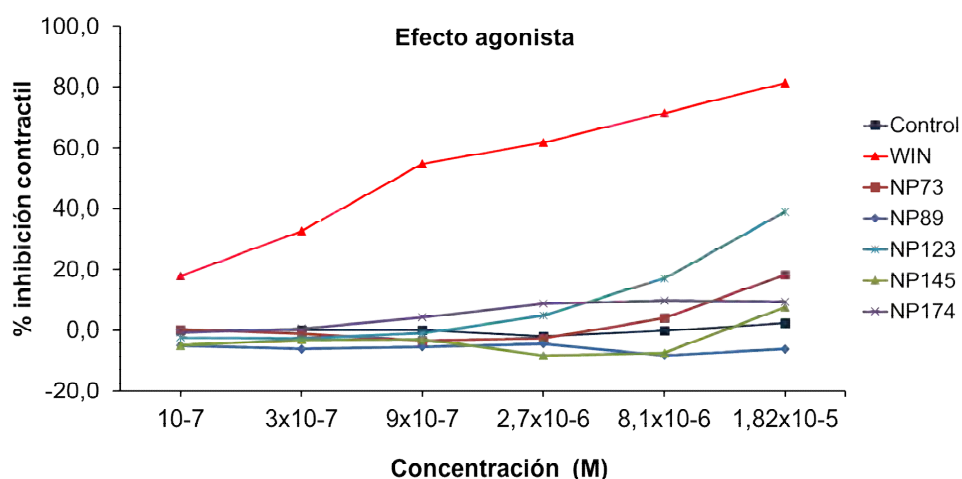
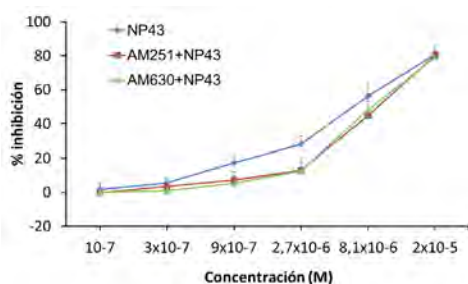


Figura 22. Representación gráfica de la respuesta inhibitoria de la contracción de los compuestos sintetizados **16 (NP123)**, **19 (NP89)**, **30 (NP73)**, **37 (NP145)** y **39 (NP174)** que no presentan efecto agonista.

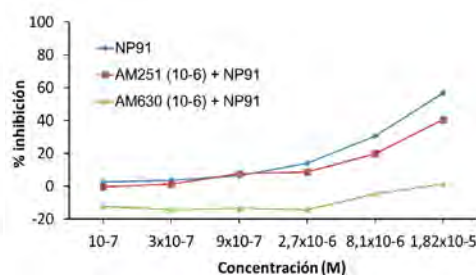
Con el fin de confirmar que el efecto producido es consecuencia de la interacción con los receptores cannabinoides, se realizaron estudios complementarios que consisten en determinar si el efecto producido por los derivados carbonílicos de 1-indazolilo es bloqueado por los antagonistas selectivos CB1, AM251, y CB2, AM630.

Todos los derivados que se recogen en la figura 23 son antagonizados significativamente por el antagonista selectivo AM630 lo que demuestra que se comportan como agonistas CB2.

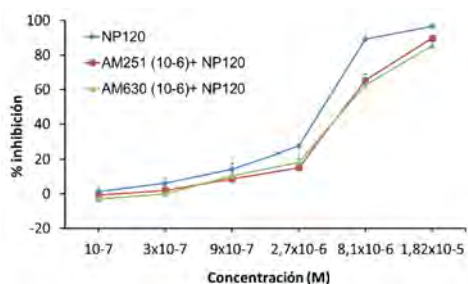
22 (NP43)



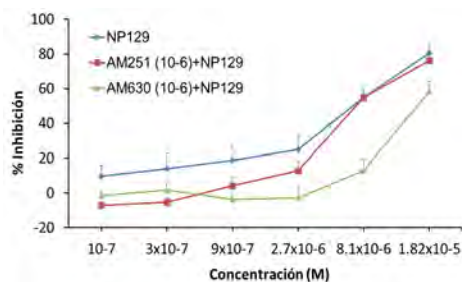
34 (NP91):



40 (NP120):



41 (NP129):



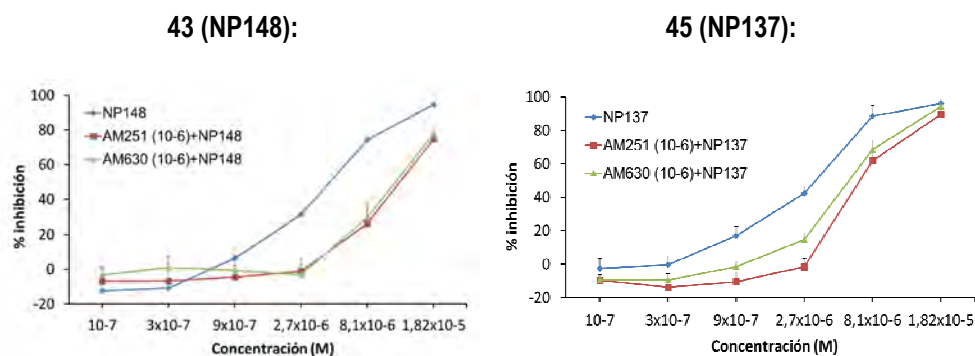


Figura 23. Reversión del efecto agonista de los compuestos **22** (NP43), **34** (NP91), **40** (NP120), **41** (NP129), **43** (NP148) y **45** (NP137) producida por los antagonistas CB1 (AM251) y CB2 (AM630).

Por otra parte, en la figura 24, se muestra el perfil farmacológico de los compuestos **29** (NP152), **32** (NP101) y **36** (NP124) que presentan un marcado carácter agonista CB1. El derivado **36** (NP124) se comporta como un agonista parcial CB1.

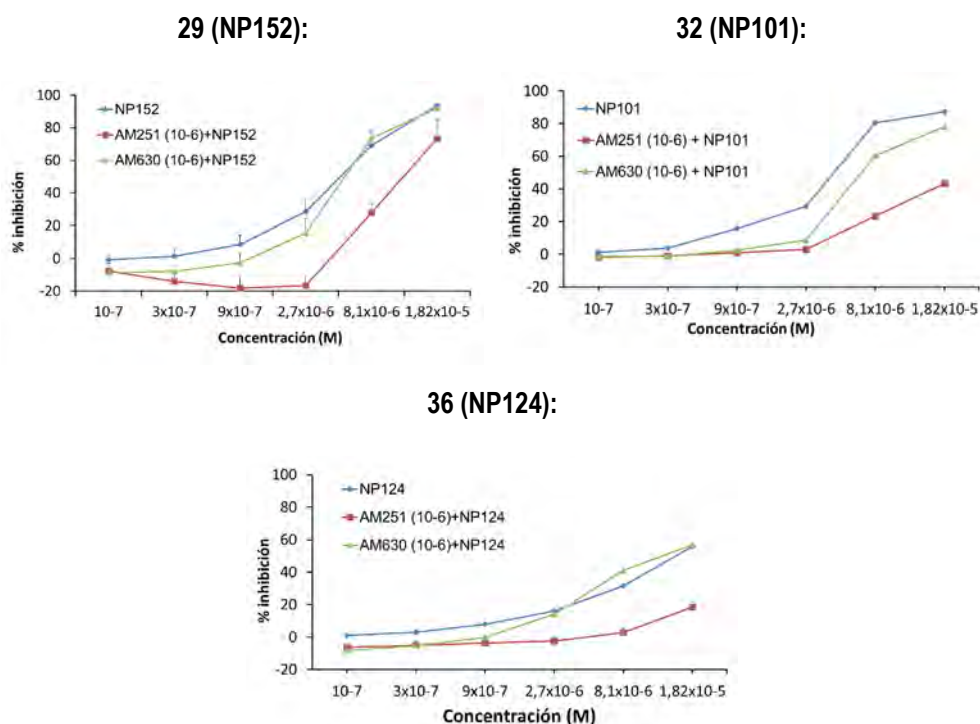


Figura 24. Reversión del efecto agonista de los compuestos **29** (NP152), **32** (NP101) y **36** (NP124) producida por los antagonistas CB1 (AM251) y CB2 (AM630).

Finalmente, los estudios realizados en los compuestos **26** (NP154), **42** (NP128) y **44** (NP132) demostraron que no se comportan como agonistas de los receptores cannabinoides ya que el efecto observado no es antagonizado ni por AM251 ni por AM630.

En la tabla 7, se recogen los datos del efecto agonista de todos los compuestos evaluados.

Tabla 7. Efecto agonista de los derivados **16 (NP123)**, **19 (NP89)**, **22 (NP43)**, **26 (NP154)**, **29 (NP152)**, **30 (NP73)**, **34 (NP91)**, **36 (NP124)**, **37 (NP145)**, **39 (NP174)**, **40 (NP120)**, **41 (NP129)**, **42 (NP128)**, **43 (NP148)**, **44 (NP132)** y **45 (NP137)**.

Compuesto	R ₁	R ₂	n	R ₃	Efecto cannabinoide
16 NP123	4-bifenililo	dimetilamino	3	H	Sin efecto
19 NP89	4-bifenililo	diisopropilamino	2	H	Sin efecto
22 NP43	2,3-diclorofenilo	pirrolidinilo	2	H	Agonista CB2
26 NP154	1-naftilo	pirrolidinilo	3	H	No agonista CB
29 NP152	1-naftilo	piperidino	2	H	Agonista CB1/CB2
30 NP73	2-naftilo	piperidino	2	H	Sin efecto
32 NP101	2,3-diclorofenilo	piperidino	2	H	Agonista CB1/CB2
34 NP91	2,4,6-trimetilfenilo	piperidino	2	H	Agonista parcial CB2
36 NP124	1-naftilo	piperidino	3	H	Agonista CB1
37 NP145	1-naftilo	piperidino	3	6-Cl	Sin efecto
39 NP174	4-bifenililo	piperidino	3	H	Sin efecto
40 NP120	2,3-diclorofenilo	piperidino	3	H	Agonista CB2
41 NP129	3-cloro-2-fluorofenilo	piperidino	3	H	Agonista CB2
42 NP128	2,4,6-trimetilfenilo	piperidino	3	H	No agonista CB
43 NP148	2-benciloxifenilo	piperidino	3	H	Agonista CB2
44 NP132	4-clorobencilo	piperidino	3	H	No agonista CB
45 NP137	4-metoxibencilo	piperidino	3	H	Agonista CB2

Como se puede observar, la mayoría de los derivados que han presentado capacidad agonista CB2 tienen en su estructura un grupo piperidino con una cadena de 3 eslabones, a excepción del compuesto **22 (NP43)** que dispone de un grupo pirrolidinilo y n=2.

En relación a las naftilcetonas, aquellas con perfil cannabinoide muestran un comportamiento poco claro. En algunos casos son agonistas parciales (**36, NP124**) y en otros tienen un mayor carácter CB1 (**29, NP152**). Además, la presencia de un átomo de cloro en posición 6 del esqueleto de indazol (**37, NP145**), elimina completamente el carácter cannabinoide del correspondiente derivado **36 (NP124)**.

Si ahora se analizan las 4-bifenilicetonas, **19 (NP89)**, **19 (NP89)** y **39 (NP174)**, se puede ver como apenas muestran efecto agonista.

Finalmente, las arilcetonas que se comportan como agonistas cannabinoide CB2 disponen de un grupo 2,3-diclorofenil **22 (NP43)** y **40 (NP120)**, 3-cloro-2-fluorofenil **41 (NP129)**, 2-benciloxifenil **43 (NP148)** y 4-metoxibencil **45 (NP137)** en posición R₁.

5.6. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO COMO FÁRMACOS MULTIDIANA

Una vez se han realizado los ensayos para las enzimas BuChE y BACE-1 y el receptor CB2, se ha procedido al análisis de los datos.

De acuerdo con los resultados obtenidos que se recogen en las tablas 4 y 5, la valoración de los compuestos que se comportan como fármacos multidiana se describe en la tabla 8.

Como se observa en la tabla 7, según las enzimas BuChE y BACE-1, hay tres derivados, el **36 (NP124)**, **37 (NP145)** y **42 (NP128)**, que presentan mayor capacidad de inhibición en dichas dianas que PGN33 y los fármacos de referencia, donepezilo y rivastigmina. De los tres, el mejor compuesto es el **37 (NP145)**, ya que es inhibidor de la enzima BACE-1 con un porcentaje superior al 50% y la IC₅₀ en la enzima BuChE es del orden nanomolar. El compuesto **36 (NP124)**, si bien es el más potente como inhibidor de BuChE, es agonista parcial del receptor CB1.

Tabla 8. Indazolilcetonas que presentan un comportamiento como fármaco multidiana.

Compuesto	R ₁	R ₂	n	R ₃	IC ₅₀ BuChE	BACE-1	Efecto cannabinoide
<u>BuChE y BACE-1:</u>							
36 NP124	1-naftilo	piperidino	3	H	0,07 nM	42%	Agonista parcial CB1
37 NP145	1-naftilo	piperidino	3	6-Cl	6,4 nM	53%	Sin efecto
42 NP128	2,4,6-trimetilfenilo	piperidino	3	H	0,58 µM	45%	No agonista
<u>BuChE y CB2:</u>							
29 NP152	1-naftilo	piperidino	2	H	0,26 nM	11%	Agonista CB1/CB2
32 NP101	2,3-diclorofenil	Piperidino	2	H	0,6 µM	18%	Agonista CB1/CB2
34 NP91	2,4,6-trimetilfenilo	piperidino	2	H	0,29 µM	11%	Agonista parcial CB2
<u>BACE-1 y CB2:</u>							
45 NP137	4-metoxibencilo	piperidino	3	H	>10 µM	60%	Agonista CB2
<u>BuChE, BACE-1 y CB2:</u>							
22 NP43	2,3-diclorofenilo	1-pirrolidinilo	2	H	0,23 µM	32,6%	Agonista CB2
40 NP120	2,3-diclorofenilo	piperidino	3	H	0,08 µM	45,1%	Agonista CB2
41 NP129	3-cloro-2-fluorofenilo	piperidino	3	H	0,80 µM	34%	Agonista CB2
43 NP148	2-benciloxifenilo	piperidino	3	H	3 nM	38%	Agonista CB2

^a Porcentaje de inhibición a 10 µM

Atendiendo a la enzima BuChE y el receptor CB2, se han encontrado tres compuestos que muestran un buen resultado, el **29 (NP152)**, **32 (NP101)** y **34 (NP91)**, donde destaca el **29 (NP152)** ya que su actividad en la enzima BuChE está en el rango nanomolar. Entre los otros dos derivados, a pesar de tener una IC_{50} del orden micromolar, igualmente inferior al de referencia, el compuesto **34 (NP91)** ha mostrado capacidad agonista parcial CB2.

En cuanto a la enzima BACE-1 y el receptor CB2, el compuesto más interesante es el **45 (NP137)**. Este derivado es un agonista del receptor CB2 y presenta el mayor porcentaje de inhibición de la enzima BACE-1 (60%).

Los derivados más interesantes son el **22 (NP43)**, **40 (NP120)**, **41 (NP129)** y **43 (NP148)**, ya que han mostrado ser eficaces en los tres sistemas biológicos objetivo. Todos ellos presentan un buen perfil, pero el que dispone globalmente de un mejor comportamiento multidiana es el **43 (NP148)**, puesto que es agonista CB2, inhibidor de la enzima BACE-1 en casi un 40% e inhibidor de la enzima BuChE en el rango nanomolar.

Considerando los resultados experimentales obtenidos, se seleccionaron dos agonistas cannabinoides para posteriores estudios, un derivado que actúa en dos dianas, la enzima BACE-1 y el receptor CB2, como es el compuesto **45 (NP137)**; y un compuesto que actúa en las tres dianas objetivo, **43 (NP148)** (Figura 25).

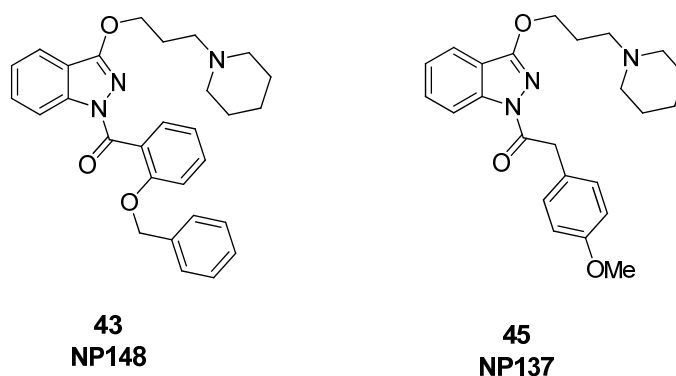


Figura 25. Estructura de las indazolilcetonas seleccionadas para ampliar su perfil farmacológico, **43 (NP148)** y **45 (NP137)**.

5.7. ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR EN MODELOS CELULARES DE ALZHEIMER

Para la realización de estos estudios, llevados a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC por el grupo de la Dra. M^a Ángeles Martín Requero, se utilizaron dos compuestos previamente seleccionados, el **45 (NP137)**, agonista CB2 con actividad inhibidora de la enzima BACE-1; y el **43 (NP148)**, agonista cannabinoide inhibidor de las enzimas BACE-1 y BuChE.

En primer lugar, se valoró la eficacia de estos compuestos en la actividad proliferativa de linfocitos inmortalizados derivados de pacientes de Alzheimer esporádico y, en segundo lugar, se estudió el posible efecto neuroprotector de estos compuestos en cultivos primarios de neuronas corticales de rata tratadas con β -amiloide.

El uso de líneas linfoblásticas de pacientes como modelo experimental para el estudio de eventos patogénicos relevantes en los procesos neurodegenerativos está ampliamente acreditado. Los linfoblastos de pacientes de EA presentan alteraciones en el control del ciclo celular como consecuencia de fallos en los procesos de señalización celular mediados por PI3K/Akt, que resultan en un incremento en la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb), facilitando el tránsito entre las fases S y G2/M del ciclo celular¹³⁰.

Estas alteraciones se consideran manifestaciones sistémicas de la entrada aberrante en el ciclo celular de neuronas vulnerables, uno de los eventos patogénicos más tempranos de la EA¹³¹.

Inicialmente se realizaron experimentos de dosis-respuesta para analizar la influencia de los derivados **43 (NP148)** y **45 (NP137)** en la viabilidad celular. Como se puede observar en la Figura 26A, la administración de dosis crecientes de estos compuestos reduce la viabilidad celular preferentemente en los linfoblastos de pacientes de la EA.

Por otro lado, en la Figura 26B, se muestra que la tasa proliferativa de linfoblastos de EA fue significativamente mayor que la de las células control, estando de acuerdo con los resultados previos¹³⁰ y teniendo en cuenta que la administración de **43 (NP148)** y **45 (NP137)** a una concentración de 5 μ M reduce efectivamente la tasa de proliferación celular en linfoblastos de pacientes control de EA sin afectar significativamente a los linfoblastos controles.

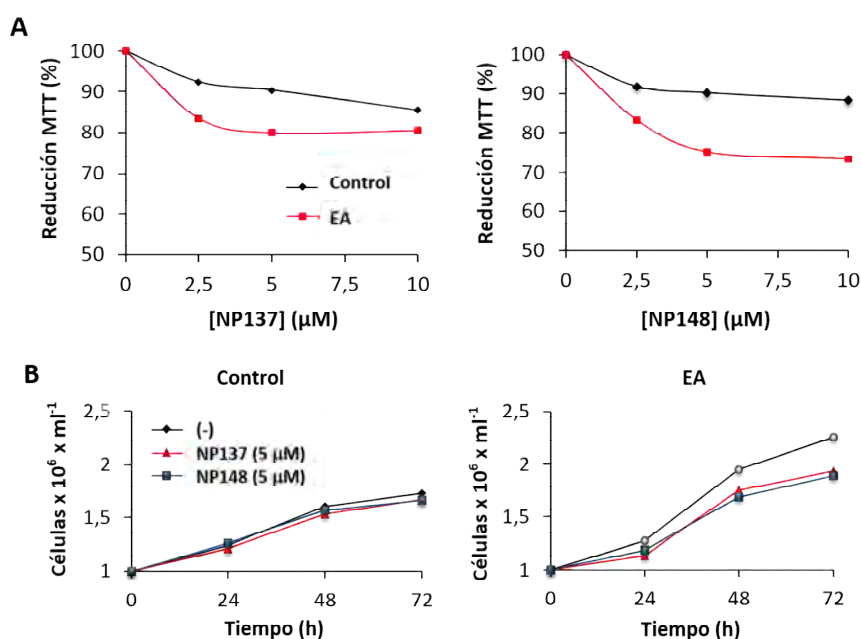


Figura 26. Efectos de los compuestos **43 (NP148)** y **45 (NP137)** sobre (A) la viabilidad celular y (B) la actividad proliferativa.

El efecto antiproliferativo de los agonistas CB2 está acompañado del bloqueo de la sobreactivación de PI3K/Akt y de la hiperfosforilación de la proteína pRb en linfoblastos de la EA tras 72 horas de estimulación con suero (Figura 27).

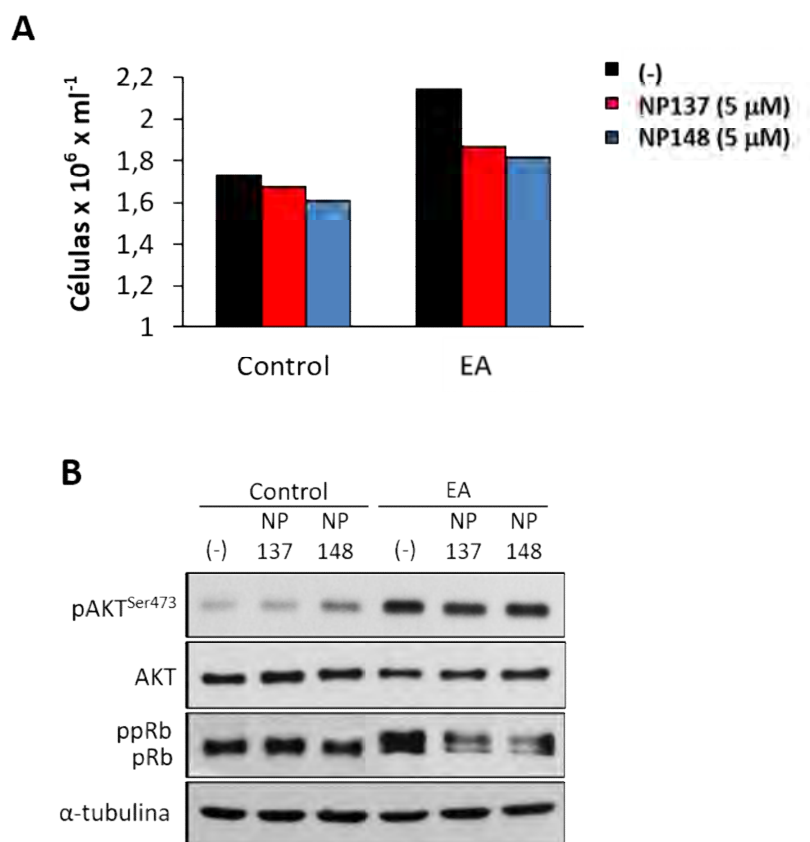


Figura 27. Efectos de los compuestos **43** (NP148) y **45** (NP137) sobre (A) la proliferación celular y (B) el estado de fosforilación de Akt y pRb.

En definitiva, estos resultados muestran que los agonistas CB2 ensayados son capaces de revertir la respuesta anómala de los linfoblastos de pacientes de EA. Con objeto de validar estos resultados obtenidos en células extraneurales de pacientes, se procedió a valorar el potencial neuroprotector de estos compuestos en cultivos primarios de neuronas corticales de rata tratados con el péptido β -amiloide.

La siguiente figura recoge los resultados de estos experimentos. Como se puede observar, ambos compuestos revierten la muerte celular inducida por el péptido β -amiloide (Figura 28).

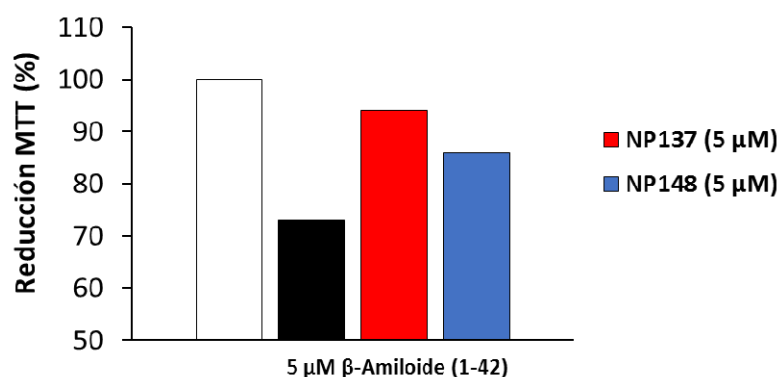


Figura 28. Efecto de la adición de los derivados **43** (NP148) y **45** (NP137) en la supervivencia de cultivos primarios de neuronas corticales.

5.8. ESTUDIO DE *IN VIVO*

Tras conocer los resultados en modelos celulares de los dos compuestos seleccionados, **43** (NP148) y **45** (NP137), se decidió evaluar el efecto de estos compuestos en un modelo *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer. Este estudio fue realizado por el grupo de la Dra. María López de Ceballos en el Instituto Cajal del CSIC.

Para determinar las alteraciones cognitivas que ocurrían en este modelo se llevó a cabo una prueba de aprendizaje espacial, conocida con el laberinto de agua de Morris (*Water Maze*). Ésta consiste en una prueba de navegación espacial en la cual se entrena a los ratones para que encuentren una plataforma escondida en una piscina circular de agua de 100 cm de diámetro⁶³.

Para llevar a cabo este ensayo se emplearon ratones macho TgAPP con 12 mutaciones (línea 2576), de 10 meses de edad al inicio de tratamiento. Los ratones silvestres (*Wild type*) de estas mismas camadas se utilizaron como controles y sólo recibieron vehículo (DMSO, 0,25%).

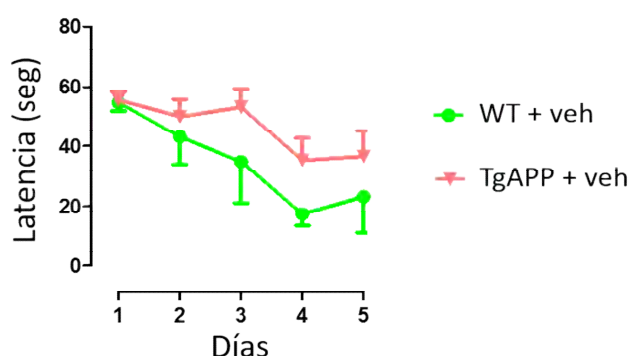


Figura 29. Resultado de la prueba de aprendizaje espacial de los animales control o *wild type* y TgAPP, ambos tratados con vehículo, tras 5 días de entrenamiento.

Como se puede observar en la figura 29, los ratones control (WT) aprendieron a encontrar la plataforma escondida durante los 5 días que duró el entrenamiento, mientras que los ratones TgAPP tratados con vehículo mostraron un déficit en el aprendizaje ya que los tiempos de latencia en encontrar la plataforma fueron significativamente mayores (aproximadamente 20 seg.).

A continuación, se trató a los ratones control con los dos compuestos derivados carbonílicos de 1-indazolilo **43** (NP148) y **45** (NP137) y se comparó su comportamiento con el de los ratones WT que sólo habían recibido vehículo.

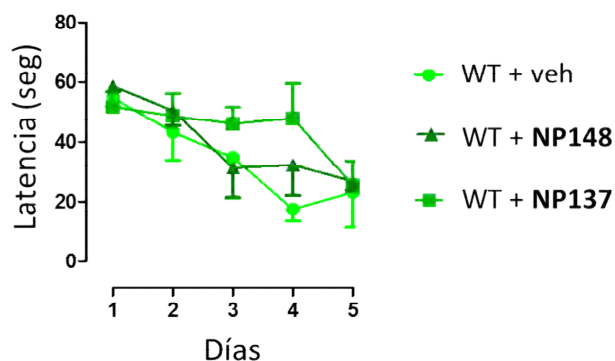


Figura 30. Resultado de la prueba de aprendizaje espacial de los animales control o *wild type* que han sido tratados con los compuestos **43** (NP148) y **45** (NP137), tras 5 días de entrenamiento.

Si se analiza la figura 30, se puede ver que el compuesto **45** (NP137) retrasó el aprendizaje de los ratones WT, pero no se vio alterado el desempeño de la tarea el último día. En cambio, el compuesto **43** (NP148) careció de efecto en este grupo de ratones.

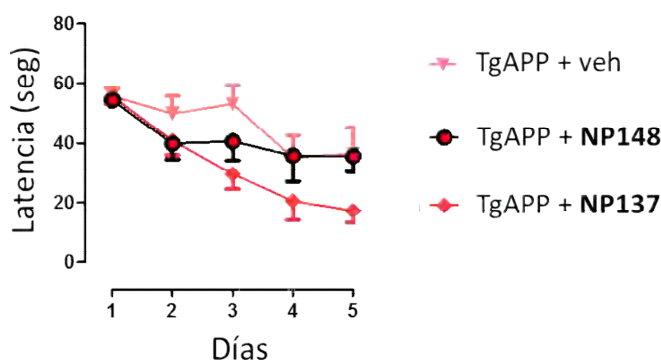


Figura 31. Resultado de la prueba de aprendizaje espacial de los animales TgAPP que han sido tratados con los compuestos **43** (NP148) y **45** (NP137), tras 5 días de entrenamiento.

Finalmente, los ratones TgAPP fueron tratados con los compuestos **43** (NP148) y **45** (NP137) para comprobar la verdadera influencia de los mismos en el deterioro cognitivo que padecen. En la figura 31, se muestran los resultados obtenidos tras la realización de la prueba.

Como se puede apreciar, los ratones que han recibido el compuesto **43 (NP148)** muestran una mejora el segundo día en su aprendizaje, pero no se observa evolución el resto de los días igualando el tiempo de latencia el último día con los ratones TgAPP, por lo que se puede decir que no produjeron ningún efecto en los mismos.

Sin embargo, el compuesto **45 (NP137)** normaliza completamente y de manera constante la memoria espacial y el aprendizaje de los ratones con el péptido A β sobreexpresado con una diferencia de aproximadamente 20 seg. el último día.

6. ESTUDIOS COMPUTACIONALES

6.1. ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LOS LIGANDOS MULTIDIANA

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento del sitio y en el tipo de unión de esta nueva familia de fármacos se han realizado estudios de acoplamiento molecular o *docking* para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos multidiana derivados de indazolilcetonas.

Las **técnicas de docking** evalúan la actividad potencial de una quimioteca de compuestos, posicionada en el sitio de unión de la diana, a partir de la interacción proteína-ligando. Asimismo, dichas técnicas permiten la identificación del modo de unión, es decir, la orientación y conformación que el ligando adopta en la cavidad de la proteína, y, menos frecuentemente, se utilizan para identificar el sitio de unión (*blind docking*).

Un protocolo de *docking* se caracteriza tradicionalmente por dos aspectos: el *docking* o método seguido para muestrear el espacio conformacional del complejo ligando-diana, y la función de *scoring* utilizada para evaluar la afinidad de la interacción ligando-macromolécula. La parte más conflictiva es la función de *scoring* para predecir la afinidad de dicha unión.

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron empleando dos aproximaciones diferentes. Así, el estudio de simulación de la formación de los complejos ligando-CB2R y ligando-BuChE se efectuó con el programa FlexiDock^{132, 133} implementado en el paquete de programas SYBYL 7.2¹³⁴. FlexiDock permite realizar un *docking* flexible, mediante una búsqueda de las posibles orientaciones del ligando en el centro activo de la proteína, mediante el uso de algoritmos genéticos. Así, el programa analiza todas las posibles conformaciones del ligando en el interior del centro activo del receptor, modificando tanto las cadenas laterales de la diana como las conformaciones del ligando.

Los complejos ligandos-BACE-1 se estudiaron con la utilización del programa AutoDock¹³⁵. AutoDock está formado por dos subprogramas (AutoGrid y AutoDock).

El primero calcula una red de puntos que describe el receptor biológico de interés, mientras que el segundo utiliza los resultados del primero para realizar el *docking* del ligando, al que se le da la máxima flexibilidad conformacional.

Para facilitar la discusión de los resultados obtenidos con las tres dianas, el análisis de los resultados se ha hecho con los derivados carbonílicos de indazol más interesantes en cada diana.

En primer lugar se construyeron los complejos con cada uno de los ligandos y se minimizaron empleando el campo de fuerzas MMFF94^{136,137} que sirvieron como entrada inicial para los estudios de *docking*. Para cada inhibidor, fue utilizada la conformación de menor energía de interacción y la más poblada para su posterior análisis. La energía de enlace y las interacciones entre cada inhibidor y la enzima se calcularon utilizando el programa DOCK implementado en Sybyl y el programa *Ligand Proteins Calculations* (LPC)¹³⁸, respectivamente (véase la parte experimental para más detalles).

6.1.1. Estudio computacional de los complejos ligando-BuChE

Para conocer en profundidad el comportamiento inhibitorio de los derivados carbonílicos de indazol como inhibidores de la enzima BuChE, se ha analizado la interacción de los compuestos con dicha diana. Para estos estudios se utilizó la estructura tridimensional de la enzima BuChE (código pdb: 1P0I)¹³⁹, disponible en el *Protein Data Bank (PDB)*.

Tal y como se ha comentado en la introducción de esta memoria, las enzimas colinérgicas presentan en su estructura una garganta que forma el sitio de unión del receptor. Este sitio de unión se encuentra dividido en varios subsitios: un sitio catalítico (CAS), situado en la base de la garganta y donde se encuentra la triada catalítica Ser-His-Glu, un subsitio aniónico (AS), un bolsillo de unión acilo (ABP), un agujero oxianiónico (OT) y un subsitio periférico aniónico (PAS), situado en la desembocadura de la garganta^{140,89}.

Las diferencias más importantes entre ambas enzimas, respecto a los aminoácidos involucrados, se encuentran en el PAS y en el ABP (Tabla 9).

Tabla 9. Relación de los aminoácidos involucrados en los subsitios de AChE y BuChE.

	Sitio periférico (PAS)	Bolsillo de unión acilo (ABP)	Agujero oxianiónico (OT)	Sitio aniónico (AS)	Sitio catalítico (CAS)
AChE	Tyr72 Asp74 Tyr124 Ser125 Trp286 Tyr337 Tyr341	Phe295 Phe297 Trp236 Phe338	Gly121 Gly122 Ala204	Trp86 Tyr133 Glu202 Gly448 Ile451	Ser203 His447 Glu334
BuChE	Asn68 Asp70 Gln119 Thr120 Ala328 Tyr332	Leu286 Val288 Trp231 Phe329	Gly116 Gly117 Ala199	Trp82 Tyr128 Glu197 Met437 Tyr440	Ser198 His438 Glu325

Por un lado, en la enzima AChE, los residuos aromáticos Phe295 y Phe297 del ABP, se encuentran cerca de la tríada catalítica mientras que en el caso de la enzima BuChE, los residuos equivalentes a éstos son Leu286 y Val288. Por otro lado, la enzima AChE posee además un grupo de residuos aromáticos (Tyr72, Tyr124, Trp286 y Tyr337) pertenecientes al PAS, que forma un cuello de botella en la garganta de la enzima, de manera que limita el acceso del sustrato al sitio activo. En cambio, en la enzima BuChE, este túnel hacia el centro activo está enmarcado por pequeños residuos del ABP y del PAS, como Leu286, Val288 y Ala328 (Figura 31).

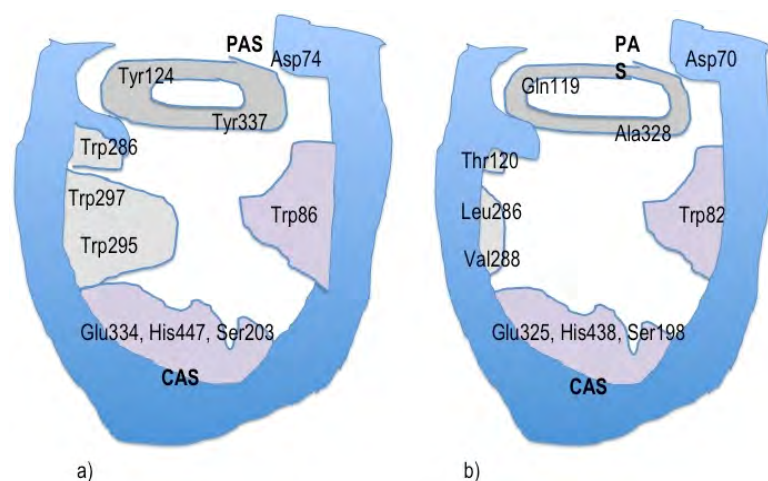


Figura 31. Representación esquemática de los sitios de unión de a) AChE y b) BuChE. Figura adaptada¹⁴¹.

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de algunos de los compuestos más interesantes, **29 (NP152)**, **36 (NP124)** y **43 (NP148)**; en relación a la diana BuChE.

El análisis de los estudios de *docking* puso de manifiesto que estos compuestos se disponen a lo largo de la garganta entre el sitio periférico (PAS) y el sitio catalítico (CAS) (Figura 32), de forma análoga a lo descrito con la familia de éteres de indazol⁸⁷. Claramente hay dos grupos de soluciones o disposiciones diferentes de los derivados a lo largo de la garganta de la enzima BuChE. Para realizar una exposición más clara de las interacciones existentes, se discutirá solamente los resultados obtenidos con los compuestos más interesantes del grupo, que presentan una inhibición en la enzima BuChE en el orden nanomolar, los compuestos **29 (NP152)** y **43 (NP148)**.

Analizando los resultados en detalle, se muestran dos conformaciones mayoritarias de los derivados carbonílicos de indazol, una alargada y otra plegada. La conformación plegada permite la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno de la agrupación éter y el hidrógeno del grupo amino protonado del anillo de piperidina, lo que la convierte en una disposición más estable. En la figura 33 se recoge como ejemplo la superposición estructural de las dos soluciones para el derivado **29 (NP152)**.

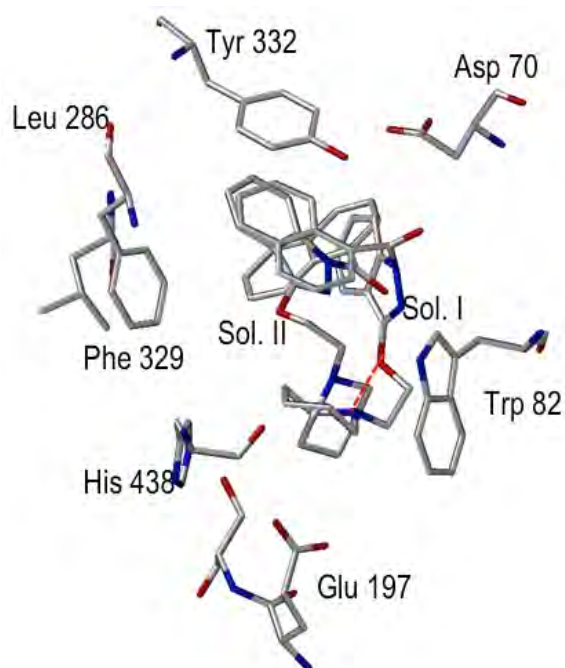
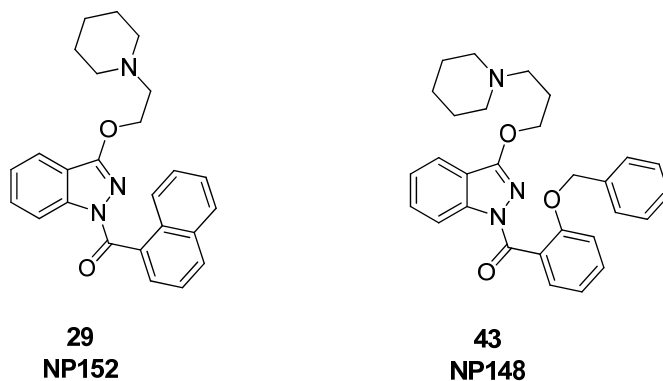


Figura 33. Superposición estructural de las soluciones I y II del derivado **29 (NP152)**.

En la tabla 10, se recogen las interacciones claves de los derivados **29 (NP152)** y **43 (NP148)** con la enzima BuChE en las dos soluciones posibles, plegada (Solución I) y alargada (Solución II). Como se puede observar, las soluciones de tipo I presentan un mayor número de interacciones con los residuos clave de la garganta catalítica de la enzima BuChE. Las interacciones más relevantes se producen con el sitio periférico (PAS), el sitio aniónico (AS) y el sitio catalítico (CAS). En este último se ha podido determinar una interacción π -CH entre el anillo de piridinil y el residuo de la triada catalítica His438. En cuanto al PAS, las interacciones que gobiernan la unión con el sitio periférico son con los residuos Asp70, Thr120 y Tyr132. Además, también hay que destacar el puente iónico que se produce entre el NH^+ del anillo de piperidinil y el residuo Glu197 del AS (Figura 33).

Tabla 10. Interacciones claves de los derivados de **29 (NP152)** y **43 (NP148)** con la enzima BuChE.

	Solución I		Solución II	
Residuo	NP152	NP148	NP152	NP148
Asp70	VdW	VdW	-	-
Trp82	-	-	π -CH _{piperidinil}	π -CH _{piperidinil}
Gly116	VdW	VdW	VdW	VdW
Thr120	OH _{Thr} - π _{indazol} EH OH _{Tyr} - O _{eter}	OH _{Thr} - π _{indazol}	-	EH OH _{Tyr} -CO
Glu197	PI CO ₂ -NH ⁺ _{piperidinil}	PI CO ₂ -NH ⁺ _{piperidinil}	-	-
Phe329	-	π - π _{R1}	-	-
Tyr332	π - π _{R1}	π - π _{R1} EH OH _{Tyr} - O _{R1}	π - π _{indazol}	π - π _{indazol}
Met437	-	VdW	-	-
His438	π -CH _{piperidinil}	π -CH _{piperidinil}	π -CH _{piperidinil}	π -CH _{piperidinil}

EH: Enlace de Hidrogeno; PI: Puente Iónico; VdW: Van der Waals

Como se ha comentado anteriormente los derivados se sitúan a lo largo de la garganta de la enzima BuChE, de manera que el grupo piperidinil se dispone hacia el interior de dicha garganta apuntando hacia los residuos catalíticos (Glu197, Ser198 y His438).

Analizando la disposición de cada solución junto con las interacciones se observa que, en la solución I o conformación plegada, el anillo de indazol está situado hacia el exterior de la garganta y el grupo aromático en R₁ está, en cambio, hacia el interior.

Mientras que en la solución II o conformación alargada, la disposición es diametralmente opuesta, siendo el esqueleto de indazol el que se dispone hacia el interior de la garganta, generando interacciones menos importantes con el receptor (Figura 34).

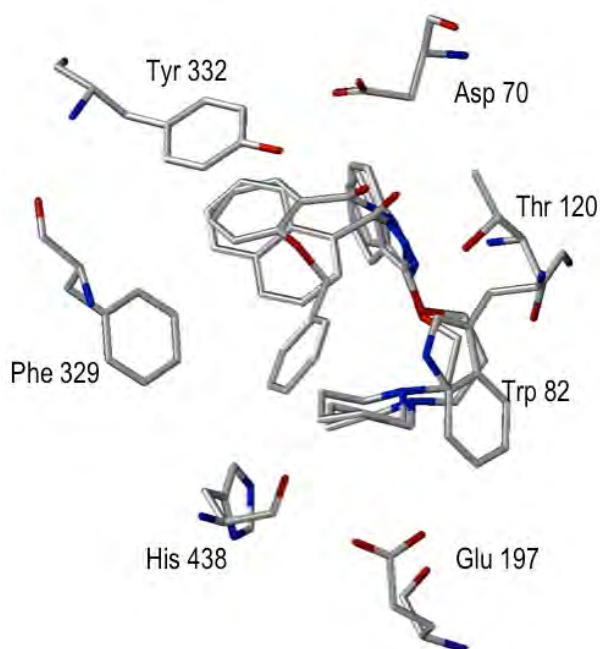


Figura 34. Superposición estructural de los derivados **29 (NP152)** y **43 (NP148)**.

Por tanto, con estos resultados la conclusión que se puede sacar es que las soluciones tipo I son más estables que las de tipo II y los derivados con la cadena de 3 eslabones en R_2 son más estables debido al anillo que se forma con el puente de hidrógeno intramolecular.

Así, se puede decir que estos derivados se sitúan a lo largo de la garganta catalítica de la enzima BuChE interaccionando tanto con el sitio catalítico CAS como con el sitio periférico PAS. Según esta disposición estos compuestos presentan una inhibición mixta.

En relación a la longitud de la cadena en la posición R_2 , se observa que en general la actividad inhibitoria de los derivados es mejor cuando se trata de una cadena propoxi ($n=3$) en lugar de etoxi ($n=2$).

Para entender mejor esta diferencia en la actividad, se han utilizado como ejemplo la pareja de compuestos **29 (NP152)** y **36 (NP124)**.

Como se ha podido ver anteriormente, la conformación bioactiva es la forma plegada de los compuestos, gracias a la formación del puente de hidrógeno intramolecular. En el caso del **36 (NP124)**, entre el NH^+ del anillo de piperidinil y el oxígeno de la agrupación éter se formará un ciclo de 6 eslabones que estabiliza mejor la conformación que el **29 (NP152)** (Figura 35).

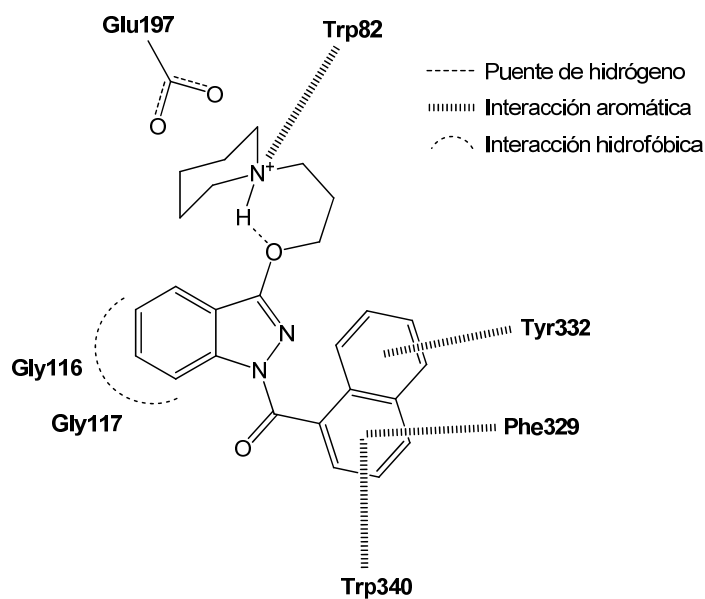


Figura 35. Representación esquemática del sitio de unión del complejo BuChE-NP124.

Gracias a ello, este anillo intramolecular se sitúa en un bolsillo hidrofóbico formado por los residuos Gly116, Gly117, Thr120 y Gly121. Además de las interacciones que presenta este derivado, hay una interacción π -CH entre el ciclo de 6 eslabones y el residuo Trp82, que consigue que el compuesto quede completamente anclado y pueda realizar una efectiva inhibición de la enzima (Figura 36).

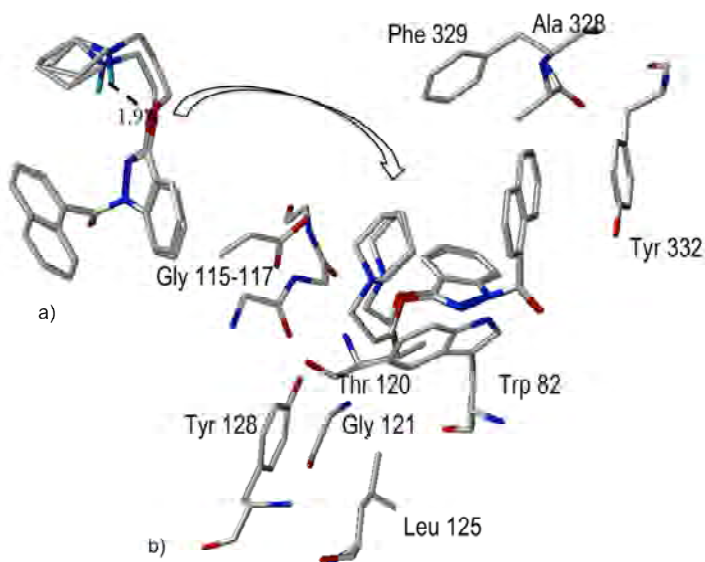


Figura 36. a) Superposición estructural de los derivados 27 (NP152) y 34 (NP124). Se muestra el puente de hidrógeno en el derivado 34 (NP124). b) Sitio de unión en la enzima BuChE de ambos derivados.

6.1.2. Estudio computacional con el receptor cannabinoide CB2

Para realizar los estudios de *docking*, se emplearon unos modelos cannabinoides contruidos y refinados por nuestro grupo de investigación, a partir de la estructura de rayos X de la *Rodopsina bovina* en su forma inactiva (Código pdb: 1F88)⁹⁴, siguiendo algunos aspectos clave para la modelización de la forma activa (resultados sin publicar).

La estructura tridimensional de los receptores cannabinoides, como la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G, no está determinada experimentalmente, excepto en el caso de la *Rodopsina bovina*,^{94, 142} el receptor β -adrenérgico^{96,97} y el receptor de adenosina¹⁴³. Como consecuencia de este hecho, se han aplicado diferentes metodologías computacionales para la obtención de modelos 3D de los receptores cannabinoides^{144,145,88,146,147,148}. El modelo estructural del receptor CB2 utilizado en este trabajo, corresponde a un modelo desarrollado en nuestro grupo de investigación utilizando técnicas de homología y modificado en función de los datos experimentales sobre mutaciones que han ido apareciendo.

Todo ello ha permitido tener un conocimiento bastante más realista de los aminoácidos que están implicados en el centro activo. Inicialmente, la modelización de ambos receptores CB1 y CB2 se abordó utilizando la estructura de rayos X de la *Rodopsina bovina* (Código pdb: 1F88)⁹⁴ como patrón estructural. Posteriormente, se realizaron estudios de *docking* con los cannabinoides más representativos, tanto agonistas como antagonistas/agonistas inversos. Los resultados de estos estudios confirmaron la existencia de dos sitios de unión en ambos receptores cannabinoides. Mientras que en el receptor CB1 se observó un solapamiento de ambos sitios, en el receptor CB2 están claramente bien diferenciados. Posteriormente a este trabajo diferentes estructuras de la *Rodopsina bovina* fueron cristalizadas. Así empleando esta nueva información se modificó el receptor CB2 repitiéndose de nuevo los estudios de *docking* con dos ligandos representativos, un agonista como es el WIN-55212-2 y el antagonista SR-144528 (resultados sin publicar). La elección de estos dos ligandos fue debida al número de estudios mutacionales en CB2 respecto a otros ligandos¹⁴⁹.

A continuación, se muestran los estudios de *docking* con el receptor cannabinoide CB2 realizados con las indazolilcetonas multidiana más relevantes: **22 (NP43)**; inhibidor BuChE/BACE-1 y agonista CB2), **29 (NP152)**; Inhibidor de BuChE y agonista CB1/CB2), **43 (NP148)**; inhibidor BuChE/BACE-1 y agonista CB2) y el compuesto **45 (NP137)**; inhibidor BACE-1 y agonista CB2) para estudiar la influencia del sustituyente, utilizando como compuesto de referencia el aminoalquilindol JWH-015.

En la figura 37 se muestra una superposición de las estructuras de los cuatro compuestos junto al agonista de referencia. Se puede observar que estos derivados ocupan el mismo espacio que el ligando de referencia. Los compuestos se orientan de manera que el grupo carbonilo y el indazol queden en la misma disposición que lo hace el JWH-015. Es por ello que, en todos los casos, presentan interacciones similares con los residuos del centro activo.

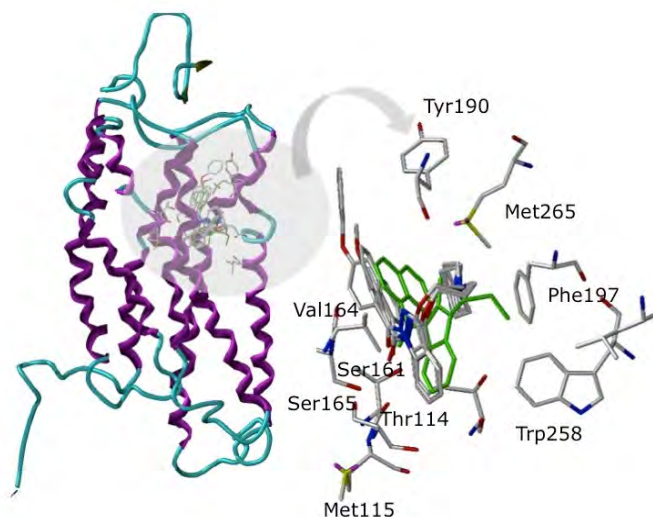


Figura 37. Superposición estructural de los compuestos **22 (NP43)**, **29 (NP152)**, **43 (NP148)**, **45 (NP137)** y JWH015 (en color verde). Los residuos del sitio de unión están mostrados en modo *stick*.

En la tabla 11 se recogen las interacciones más importantes de todos los compuestos seleccionados. El análisis de estos datos permite obtener información importante con el fin de racionalizar los resultados experimentales.

Tabla 11. Interacciones clave de los derivados de **22 (NP43)**, **29 (NP152)**, **43 (NP148)** y **45 (NP137)** y JWH-015 con el receptor CB2.

Residuo	NP43	NP152	NP148	NP137	JWH-015
Thr114	EH (O=C)	EH (O=C)	EH (O=C)	EH (O=C)	EH (O=C)
Thr118	-	$\pi_{\text{indazol}} - \text{OH}$	$\pi_{\text{indazol}} - \text{OH}$	$\pi_{\text{indazol}} - \text{OH}$	-
Met115	-	-	-	-	$\pi_{\text{indol}} - \text{SH}^*$
Ser161	-	$\pi_{\text{indazol}} - \text{OH}$	$\pi_{\text{indazol}} - \text{OH}$	$\pi_{\text{indazol}} - \text{OH}$	-
Ser165	EH (O=C)	EH (O=C)	EH (O=C)	EH (O=C)	EH (O=C)
Pro168	-	$\pi_{\text{R1}} - \text{CH}$	$\pi_{\text{R1}} - \text{CH}$	$\pi_{\text{R1}} - \text{CH}$	-
Val164	VdW	VdW	VdW	VdW	VdW
Phe197	$\pi_{\text{indazol}} - \pi$	$\pi_{\text{indazol}} - \pi$	$\pi_{\text{indazol}} - \pi$	$\pi_{\text{indazol}} - \pi$	$\pi_{\text{indol}} - \pi$
Leu201	VdW	VdW	VdW	VdW	VdW
Trp258	-	-	-	-	$\pi_{\text{indol}} - \pi$
Met265	S- π_{Ar}	S- π_{Ar}	S- π_{Ar}	S- π_{Ar}	S- π_{Ar}

EH: Enlace de Hidrogeno; VdW: Van der Waals

De forma general, estos compuestos mostraron interacciones con los aminoácidos Thr114, Thr118, Ser161, Ser165, Val164, Pro168, Phe197, Leu201 y Met265 (Tabla 11). Las interacciones que dirigen la unión de los derivados carbonílicos de indazol con el centro activo del receptor CB2 son principalmente aromáticas (Phe197, Thr118) y por puente de hidrógeno (Ser165, Thr114). Hay que resaltar las interacciones aromáticas (π -OH) entre los grupos hidroxilo (-OH) de los residuos treonina (Thr) y serina (Ser) y los anillos aromáticos presentes en los derivados carbonílicos de indazol. Otras interacciones que se preservan en toda la familia de compuestos son las interacciones hidrófobas con los residuos Val164 y Leu201 (Figura 38).

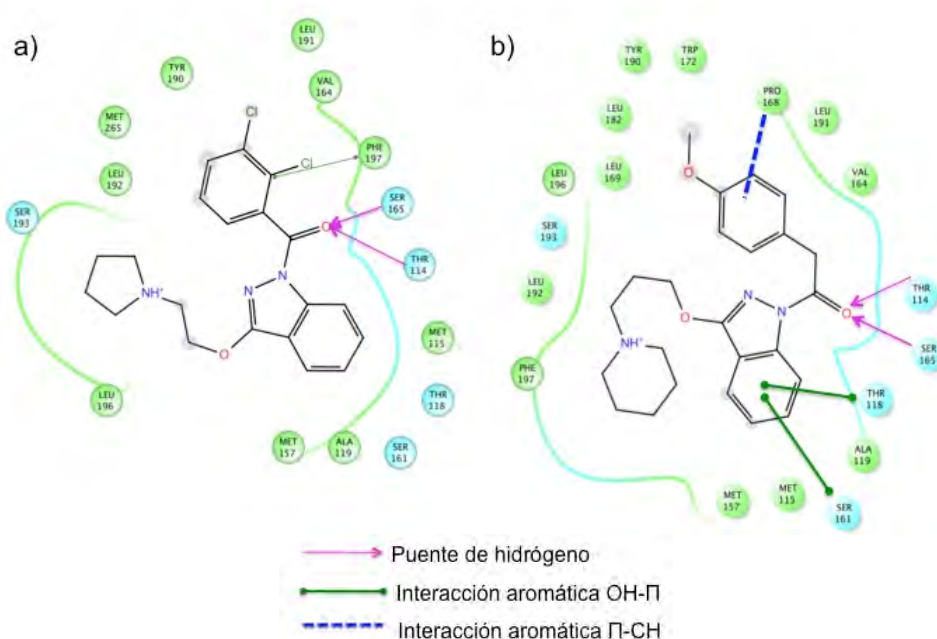


Figura 38. Representación esquemática del sitio de unión de los complejos a) CB2-NP43 y b) CB2-NP137.

Hay que destacar la importancia con los residuos Met115, Ser161, Val164, Phe197 y Leu201, ya que son aminoácidos que mediante estudios de mutagénesis se ha comprobado que están involucrados en la unión con agonistas como el WIN55212-2¹⁴⁹ (Figura 38).

Analizando los resultados de estos estudios en relación a la estructura de esta nueva familia podemos obtener varias conclusiones importantes. La presencia del grupo carbonilo favorece la interacción con el residuo Ser165 mediante puente de hidrógeno, de forma análoga al agonista conocido JWH015. Es importante destacar que esta interacción no tiene lugar en los derivados de éteres de indazol publicados anteriormente por nuestro grupo⁸⁷.

Por otro lado, el grupo de la posición R₁ junto con la longitud de la cadena en la posición R₂ (n=2 o 3) dirigen la disposición de los ligandos en el interior del centro activo y, por tanto, la actividad de estos compuestos.

En este sentido los derivados **29 (NP152)**, **43 (NP148)** y **45 (NP137)** muestran una interacción π -HC entre el anillo aromático del sustituyente en R₁ y el residuo Pro168, mientras que el derivado **22 (NP43)** no lo muestra. Otra interacción importante es un tipo C=O----HC entre el grupo carbonilo del enlace peptídico del aminoácido Tyr190 y el grupo piperidino en los tres derivados, mientras que en el resto de los compuestos esta interacción no tiene lugar.

Otras interacciones importantes que presentan estos tres derivados es una interacción π -OH con los residuos Thr118 y Ser161.

6.1.3. Estudio computacional con la enzima BACE-1

La enzima BACE-1 pertenece a la familia de las aspartil proteasas con dos aspárticos, Asp32 y Asp228, que constituyen la diada catalítica, por lo que la mayoría de los inhibidores no peptídicos desarrollados hasta la fecha poseen un grupo amino cargado.

El sitio activo de la enzima está formado por bolsillos de diferente naturaleza hidrofílica, en los que tienen que encajar los residuos del sustrato peptídico. Estos bolsillos se designan mediante la letra S y un número y los residuos del sustrato con una P y el número del bolsillo que ocupan. Además, se indica con una tilde los bolsillos o residuos que están dispuestos hacia el extremo C-terminal del sustrato, después del punto de hidrólisis. Esta enzima fue cristalizada por primera vez formando un complejo con el inhibidor peptídico OM99-2 (Código pdb: 1FKN)⁸⁴.

Actualmente existe un gran número de estructuras cristalográficas de los complejos de la enzima BACE-1 con inhibidores tanto peptídicos como no peptídicos. Un análisis de algunas de las estructuras encontradas en la base de datos PDB permitió definir el sitio de unión de la enzima BACE-1 e identificar las interacciones principales que se establecen con los inhibidores publicados hasta el momento (Figura 39).

Para los estudios de *docking* con la enzima BACE-1 se ha elegido como patrón para la validación del protocolo de *docking* el complejo BACE-1-S8Z (Código pdb: 4ACX)¹⁵⁰ ligeramente modificado como entrada para dichos estudios (Figura 40). Todo el estudio fue realizado con el programa AutoDock, como ya se ha indicado al comienzo de este capítulo.

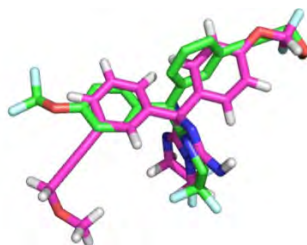


Figura 40. Superposición estructural del ligando S8Z en el sitio de unión de la enzima BACE-1. El ligando mostrado en color verde representa las coordenadas reales del mismo dentro del sitio de unión. La estructura en color rosa representa al ligando modificado para la validación de los estudios de *docking*.

Analizando detalladamente el centro activo del receptor, se pudieron determinar cuáles eran las interacciones más relevantes de este complejo (Figura 41).

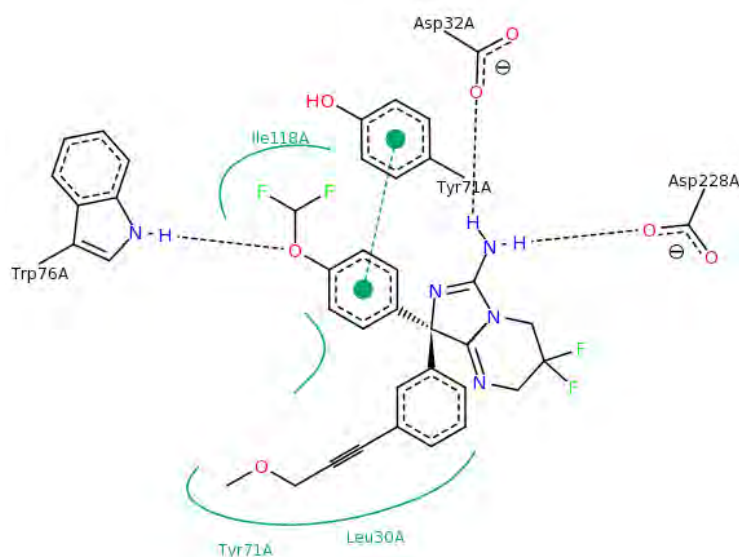
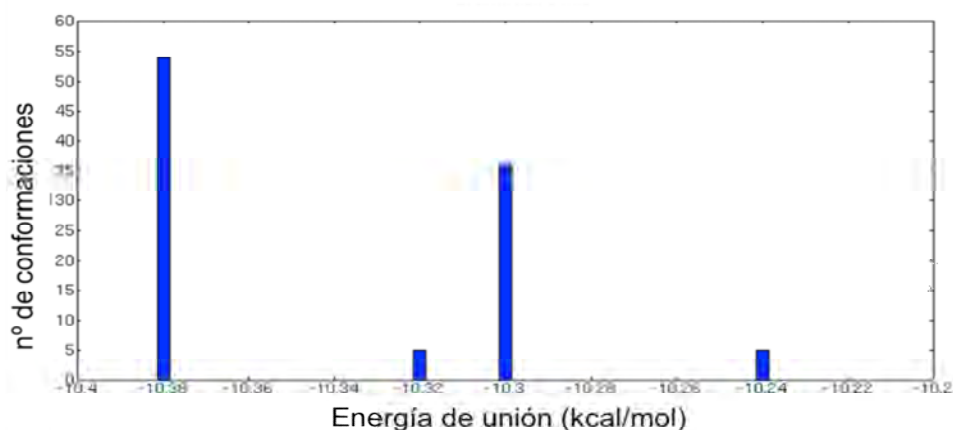


Figura 41. Representación esquemática de las interacciones más importantes en el complejo 4ACX.

Para comenzar con la validación, se agruparon las diferentes conformaciones del ligando S8Z posibles por su energía de interacción con el receptor. En la siguiente figura, se han representado los cuatro grupos o clúster de soluciones obtenidas. Claramente, el primer clúster es el más favorable tanto energéticamente como en términos de población (Figura 42).



PATRON (nº total de conformaciones)	RESULTADOS			
	Conformaciones similares al ligando original (nº total de conformaciones)	Valor RMS	Energía de interacción	Valor referencia RMS
4ACX(100) Δ RMS=0.75	1-1 (54)	0.42	-10.38	3.35
	2-1 (5)	0.48	-10.32	3.29
	3-1 (36)	0.51	-10.3	3.4

Figura 42. a) Gráfica donde están representados las diferentes soluciones obtenidas para los estudios de 4ACX. b) Energía de interacción (Kcal/mol) junto con el valor cuadrático medio o RMS (del inglés *root mean square*).

En la figura 43 se muestran la superposición estructural del ligando S8Z con la solución del primer clúster (menor energía y mayor población). Como se puede apreciar, la conformación del ligando coincide con la del clúster seleccionado. Por tanto, queda validado el protocolo.

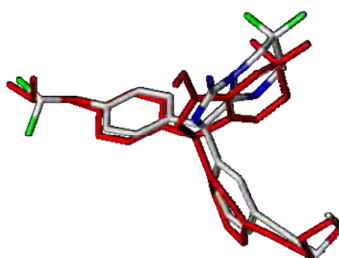


Figura 43. Superposición estructural del ligando S8Z y la solución del primer clúster.

Una vez realizada la validación, se realizaron los estudios de anclaje con los derivados carbonílicos de indazol. A continuación, se muestran los resultados obtenidos correspondientes a los compuestos **22** (NP43; agonista CB2 e inhibidor de BuChE/BACE-1), **37** (NP145; inhibidor BuChE/BACE-1) y **45** (NP137; agonista CB2 e inhibidor de BACE-1). Se analizaron en el complejo las soluciones más representativas, en términos de energía de interacción, así como las interacciones clave que tienen lugar en el interior del sitio de unión de la enzima BACE-1.

Como se puede ver en la figura 44, todos los derivados están orientados de la misma manera en el centro catalítico.

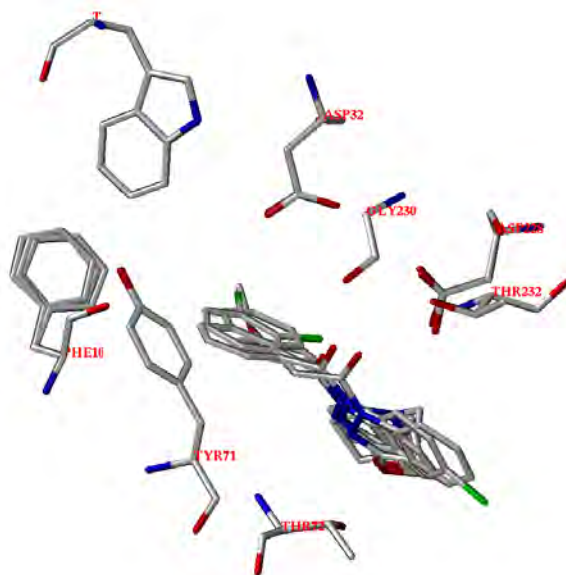
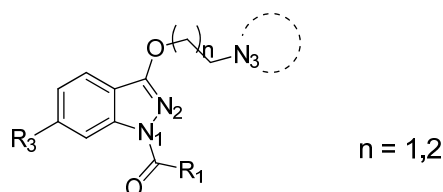


Figura 44. Superposición estructural de los derivados **22 (NP43)**, **37 (NP145)** y **45 (NP137)** en el sitio de unión de la enzima BACE-1.

Las interacciones clave de los derivados seleccionados se muestran en la tabla 12 junto con los resultados obtenidos del ligando S8Z dentro del complejo 4ACX.

Las interacciones que se muestran son similares a las del complejo patrón, lo que indica que los compuestos interaccionan en los puntos indicados para que tenga lugar una unión eficaz de los mismos con la proteína BACE-1 y, por tanto, puedan inhibir su actividad. Entre ellas, las más relevantes son las de la región catalítica, con los residuos Asp32 y Asp228.

Tabla 12. Interacciones clave entre los derivados **22 (NP43)**, **37 (NP145)** y **45 (NP137)** y los residuos del sitio de unión de la enzima BACE-1.



	Asp32	Gly34	Tyr71	Phe108	Asp228	Gly230	Thr232
4ACX	EH	EH	$\pi - \pi$	Ar	EH	EH	EH
NP43	EX (O _{asp} -Cl)	VdW	$\pi_{R1} - \pi$	$\pi_{R1} - \pi$	EH (O _{asp} -N ₃)	EX (O-Cl)	-
NP145	O _{asp} - π_{R1}	VdW	$\pi_{R1} - \pi$	$\pi_{R1} - \pi$	EH (O _{asp} -N ₃)	O- π_{R2}	-
NP137	EH (O _{asp} -CH ₃ O)	VdW	$\pi_{R1} - \pi$	$\pi_{R1} - \pi$	EH (O _{asp} -N ₃)	O- π_{R2}	EH (OH...O=C)

EX: Enlace de halógeno; EH: Enlace de hidrógeno

Si se analizan los datos de la tabla, se observa que los derivados presentan una interacción mediante puente de hidrógeno con el nitrógeno del anillo de pirrodilnil o piperidino y Asp228. Mientras que con el residuo Asp32 la interacción es de tipo más débil. Para el derivado **22 (NP43)** se establece una interacción por enlace de halógeno entre el cloro en posición 3 del grupo diclorofenil y el oxígeno del residuo Asp32. En el caso del derivado **45 (NP137)** se observa una interacción débil por enlace de hidrógeno entre este residuo, el Asp32, y el agrupamiento metoxi del sustituyente en R₁. En cambio, el derivado **37 (NP145)** presenta una interacción de tipo aromática con el grupo naftilo de la posición R₁.

Otras interacciones importantes son de tipo aromática con los residuos Tyr71, Phe108 y Gly230. Finalmente, con el derivado **45 (NP137)** se establece un enlace de hidrógeno extra entre el grupo OH del residuo Thr232 y el grupo carbonilo. Mientras que en los otros dos derivados no se produce esta interacción. Merece la pena mencionar la mejora de actividad del compuesto **37 (NP145)** respecto a su homólogo **34 (NP124)** sin el átomo de Cl en la posición 6 debido a una interacción por enlace de halógeno con la Ser325.

Comparando el sitio de unión de estos derivados con los residuos identificados anteriormente se puede explicar la moderada actividad de estos compuestos debido a la falta de interacciones con residuos importantes como son Thr72, Trp76 o Trp115.

7. CONCLUSIONES

La enfermedad de Alzheimer (EA) junto con el resto de las demencias constituye uno de los grupos de enfermedades con mayor repercusión desde el punto de vista socioeconómico y sanitario.

Aunque las cifras de mortalidad han ido aumentando en los últimos años y son en sí mismas muy importantes, lo es todavía más, la repercusión en cuanto a la tasa de morbilidad. El elevado número de personas que padecen la enfermedad causan un gran coste, no solo económico sino también emocional, relacionado con el cuidado de estos pacientes.

Los tratamientos actuales para la enfermedad de Alzheimer y algunas otras demencias son claramente inadecuados por lo que a menos que se encuentren nuevos procedimientos de prevención y tratamientos más eficaces, el impacto en la atención médica, así como las importantes repercusiones sociales y económicas van a ir en aumento en el futuro.

Teniendo en cuenta que ninguno de los fármacos utilizados en clínica aporta una solución al problema, que el último fármaco aprobado es del 2003 y que hasta la fecha todos los fármacos que han pasado por fase clínica no han dado resultados satisfactorios, se demuestra claramente la necesidad de explorar nuevas estrategias.

En este trabajo se han presentado diferentes alternativas, como estrategias innovadoras, con el objetivo de contribuir en un tratamiento más eficaz para la enfermedad de Alzheimer.

En este sentido, el objetivo fundamental del trabajo que se recoge en esta memoria, ha sido el desarrollo de un fármaco capaz de actuar simultáneamente en dos o tres dianas terapéuticas involucradas en la EA, como son el receptor cannabinoide CB2, la enzima BACE-1 y la enzima BuChE.

Las conclusiones más relevantes obtenidas en este trabajo de investigación se pueden resumir en los siguientes apartados:

En relación a los **estudios computacionales**, se pone de manifiesto que la utilización de técnicas de *docking* que predicen de manera virtual, la capacidad de interacción de los diferentes ligandos con los receptores considerados (CB2, BuChE, BACE-1) y, por tanto, seleccionar los derivados a preparar, permite reducir considerablemente los recursos humanos y económicos. En este sentido, de acuerdo a los resultados farmacológicos obtenidos se puede comprobar que el 87% de los compuestos preparados presentan actividad en alguno de los sistemas considerados ($IC_{50} \approx 10 \mu M$).

Desde un **punto de vista sintético**, se han desarrollado procedimientos experimentales adecuados para la síntesis de un conjunto representativo de derivados de (aril o aralquil)(indazolil)cetonas con una amplia diversidad estructural en el sistema de indazol que permite modular las propiedades farmacológicas en los receptores estudiados

Por último, en relación a los **estudios biológicos**, se ha constatado el cumplimiento de todos los objetivos propuestos. En este sentido, no solo se ha conseguido mejorar la actividad del cabeza de serie PGN33 como inhibidor de BuChE en un factor de $6,8 \times 10^4$ sino obtener compuestos que además de ser agonistas CB2/inhibidores de la enzima BuChE, fueran inhibidores de la enzima BACE-1.

Además, como consecuencia de la metodología utilizada, se han desarrollado compuestos muy interesantes con acción en tres dianas y con las combinaciones de dos de las tres dianas, entre los que cabe destacar:

- Inhibidor de las enzimas BuChE y BACE-1: **37 (NP145)**
- Agonista CB2 e inhibidor de la enzima BuChE: **29 (NP152)**
- Agonista CB2 e inhibidor de la enzima BACE-1: **45 (NP137)**
- Agonista CB2 e inhibidor de las enzimas BuChE y BACE-1: **43 (NP148)**

Hay que destacar como resultado más relevante que el derivado **45 (NP137)** es capaz de mejorar la capacidad cognitiva, en un modelo animal (ratón TgAPP) de la enfermedad de Alzheimer y, por tanto, es un prometedor candidato para el desarrollo de nuevos fármacos multidiana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. QUÍMICA

8.1.1. Aspectos generales

Todos los reactivos utilizados en la síntesis fueron obtenidos de las casas comerciales Sigma Aldrich, Fluka, Acros y Alfa Aesar, y fueron utilizados sin más purificación.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Reichert Jung Thermovar y no están corregidos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de ^1H -RMN (300 MHz) y ^{13}C -RMN (75 MHz) fueron registrados en condiciones estándar por un equipo Bruker AVANCE 300. Las señales de RMN se encuentran detalladas para cada compuesto y fueron asignados según el esqueleto de la figura 45.

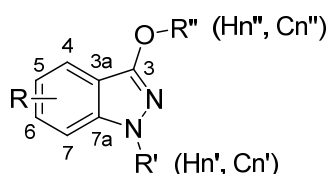


Figura 45. Esqueleto de derivados de 3-indazolol.

La cromatografía en columna de media presión (flash) se llevó a cabo con un aparato Biotage Isolera Prime de detector variable. Los cartuchos empleados para purificación en fase normal son de gel de sílice de 12 g o 25 g Biotage. En cambio, los cartuchos de purificación en fase reversa son Snaps KP C18-HS de 12 g. Los eluyentes y las proporciones empleadas se indican en cada caso.

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando placas cromatográficas de gel de sílice tipo 60 F254 (Merck), de un espesor de capa de 0,2 mm y se visualizaron por luz ultravioleta (254 y 365 nm).

Los análisis elementales de los compuestos se han realizado en el laboratorio de microanálisis del Centro de Química Orgánica "Manuel Lora-Tamayo" con un analizador Heareus CHN-O-RAPID.

Los análisis de HPLC-MS se realizaron en un aparato Waters, utilizando una columna de SurfiredTM C18 (4.6 x 50 mm, 3.5 μm) a 30°C, con un flujo medio de 0.25 mL/min con diferentes gradientes de una disolución de 0.08% de ácido fórmico en acetonitrilo (disolvente A) en una disolución de 0.1% de ácido fórmico en agua (Disolvente B) como fase móvil, que parten de la proporción especificada en cada caso y acaban en 100:0. El tiempo de gradiente utilizado (tg) y el tiempo de retención del producto (tr) se especifica en cada caso.

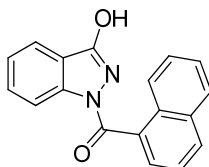
El sistema de HPLC es un Módulo de Separaciones Waters 2695 acoplado a un detector Fotodiodo Array Waters 2996 y a un Waters Micromass ZQ.

8.1.2. Métodos de síntesis

8.1.2.1. Síntesis de los derivados de 1*H*-indazol-3-ol sustituidos en posición N1

Procedimiento general. A una disolución de *R*-1*H*-3-indazolol en piridina a 0°C se le adiciona lentamente el cloruro de ácido correspondiente. La reacción se mantiene con agitación y dejando que alcance lentamente la temperatura ambiente. Una vez terminada, se vierte sobre agua y se acidifica con ácido acético. Se deja que precipite durante una noche y se filtra para recuperar el sólido. Éste se lava con agua y se deja secar al aire.

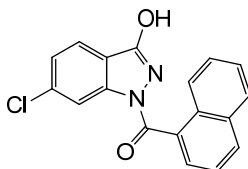
Síntesis de (1-naftil)(3-(hidroxi)indazol-1-il)cetona (47, NP77)



Se realiza a partir de 500 mg (3,72 mmol) de 1*H*-indazol-3-ol, 732 mg (3,83 mmol) de cloruro de 1-naftoilo y 20 mL de piridina. Tiempo de reacción: 16 h. Rendimiento: 851 mg (79%).

P.F. = 97-104 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,95 (s, 1H, OH); 8,87 (d, 1H, Ar); 8,60 (d, 1H, 4-H); 8,36 (d, 1H, Ar); 8,13 (d, 1H, Ar); 7,45 (t, 4H, Ar); 7,58 (d, 1H, 7-H); 7,45 (t, 1H, 5-H); 7,17 (t, 1H, 6-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 164,8 (C-1'); 148,4 (C-3); 141,8 (C-7a); 135,3 (C, Ar); 133,9 (C, Ar); 132,1 (C, Ar); 131,1 (C, Ar); 129,4 (C, Ar); 129,0 (C-5); 124,4 (C, Ar); 127,1 (C, Ar); 125,4 (C, Ar); 125,2 (C, Ar); 124,6 (C, Ar); 121,1 (C-6); 119,6 (C-7); 113,8 (C-3a); 111,2 (C-4). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 10/100, tg: 8 min., tr: 5,28, [M+H]⁺ = 289. **Anal.** (C₁₈H₁₂N₂O₂, 288,30) % experimental (% teórico) C: 74,86 (74,99); H: 4,05 (4,20); N: 9,51 (9,72).

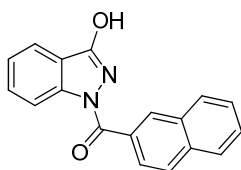
Síntesis de (6-cloro-3-hidroxiindazol-1-il)(1-naftil)cetona (48, NP143)



Se realiza a partir de 200 mg (1,19 mmol) de **N141**, 460 mg (2,37 mmol) de cloruro de 1-naftoilo y 10 mL de piridina. Tiempo de reacción: 24 h. Rendimiento: 210 g (55%).

P.F. = 173-178 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 13,10 (s, 1H, OH); 8,86 (d, 1H, 4-H); 8,80 (dd, 1H, Ar); 8,36 (d, 1H, Ar); 8,13 (dd, 1H, Ar); 7,78 - 7,73 (m, 3H, 7-H, Ar); 7,68 (t, 2H, Ar); 7,19 (dd, 1H, 5-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 164,2 (C1'); 148,5 (C-3); 142,0 (C-7a); 135,4 (C, Ar); 133,9 (C, Ar); 133,9 (C, Ar); 132,6 (C, Ar); 132,2 (C-5); 131,2 (C, Ar); 129,4 (C, Ar); 129,0 (C, Ar); 127,1 (C, Ar); 125,5 (C, Ar); 125,2 (C, Ar); 124,3 (C, Ar); 121,9 (C-6); 121,5 (C-7); 112,7 (C-3a); 110,8 (C-4). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 5,68, [M+H]⁺ = 323,20. **Anal.** (C₁₈H₁₁ClN₂O₂, 322,75) % experimental (% teórico) C: 67,05 (66,99); H: 3,44 (3,61); N: 8,68 (8,94).

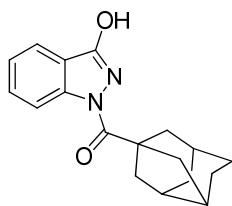
Síntesis de (2-naftil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (49, NP47)



Se realiza a partir de 301 mg (2,25 mmol) de 1H-indazol-3-ol, 428 mg (2,25 mmol) de cloruro de 2-naftoilo y 15 mL de piridina. Tiempo de reacción: 16 h. Rendimiento: 395 mg (61%).

P.F. = 121-124 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.16 (s, 1H, OH); 8,56 (s, 1H, Ar); 8.43 (d, 1H, 4-H); 8,09 - 7,97 (m, 4H, Ar); 7.83 (d, 1H, 7-H); 7,72 - 7,58 (m, 3H, 5-H, Ar); 7.45 (t, 1H, 6-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 166.8 (C-1'); 158.8 (C-3); 140.6 (C-7a); 128.0 (C-5); 124.6 (C-6); 120.4 (C-7); 117.9 (C-3a); 115.6 (C-4); 134.0 (C, Ar); 131.7 (C, Ar); 131.3 (C, Ar); 130.8 (C, Ar); 130.4 (C, Ar); 129.0 (C, Ar); 127.6 (C, Ar); 127.2 (C, Ar); 126.8 (C, Ar); 126.3 (C, Ar). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 10/90, tg: 8 min., tr: 5.08, [M+H]⁺ = 289.2. **Anal.** (C₁₄H₈N₂O₂, 288,09) % experimental (% teórico) C: 74.99 (74.85); H: 4.20 (4.10); N: 9.72 (9.74).

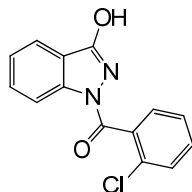
Síntesis de ((1-adamantil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (50, NP80)



Se realiza a partir de 1 g (7,45 mmol) de 1H-indazol-3-ol, 1,67 g (8,0 mmol) de cloruro de adamantoilo y 30 mL de piridina. Tiempo de reacción: 3 h. Rendimiento: 2,14 g (97%).

P.F. = 159-165 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,77 (s, 1H, OH); 7,50 (d, 1H, 4-H); 7,43-7,39 (m, 2H, 7-H, 5-H); 7,11 (t, 1H, 6-H); 2,07 (sa, 9H, adamantano); 1,77 (sa, 6H, adamantano). **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 175,1 (C-1'); 148,5 (C-3); 141,6 (C-7a); 127,3 (C-5); 120,8 (C-6); 119,1 (C-7); 113,5 (C-3a); 111,1 (C-4); 38,6 (C-adamantano); 36,1 (C-adamantano); 27,6 (C-adamantano). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 10/100, tg: 8 min, tr: 5,95, [M+H]⁺ = 297. **Anal.** (C₁₈H₂₀N₂O₂, 296,36) % experimental (% teórico) C: 73,02 (72,95); H: 6,83 (6,80); N: 9,14 (9,45).

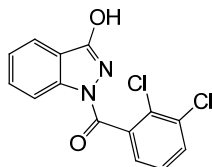
Síntesis de (2-clorofenil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (51, NP102)



Se realiza a partir de 1,47 g (10,9 mmol) de 1H-indazol-3-ol, 1,3 mL (11,7 mmol) de cloruro de 2-clorobenzilo y 15 mL de piridina. Tiempo de reacción: 6 h. Rendimiento: 2,19 g (74%).

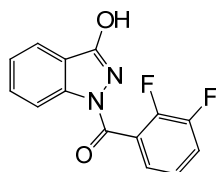
P.F. = 110-137 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 10,20 (sa, 1H, OH); 8,20 (dd, 1H, 4-H); 7,67 (d, 1H, 7-H); 7,58 - 7,54 (m, 2H, Ar); 7,46 - 7,38 (m, 3H, 5-H, Ar); 7,19 (td, 1H, 6-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 162,7 (C-1'); 148,9 (C-3); 141,6 (C-7a); 134,8 (C, Ar); 133,6 (C, Ar); 131,4 (C, Ar); 128,2 (C-5); 126,8 (C, Ar); 121,4 (C-6); 119,7 (C-7); 113,9 (C-3a); 110,5 (C-4). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 15/95, tg: 8 min., tr: 4,89, [M+H]⁺ = 273. **Anal.** (C₁₄H₉ClN₂O₂, 272,69) % experimental (% teórico) C: 57,34 (61,66); H: 4,15 (3,33); N: 9,22 (10,27).

Síntesis de (2,3-diclorofenil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (52, NP44)



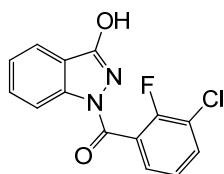
Se realiza a partir de 255 mg (1,90 mmol) de 1H-indazol-3-ol, 370 mg (1,77 mmol) de cloruro de 2,3-diclorobenzilo y 10 mL de piridina. Tiempo de reacción: 7 h. Rendimiento: 422 mg (78%).

P.F. = 112-115 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,97 (s, 1H, OH); 8,38 (d, 1H, 4-H); 7,99 (d, 1H, 7-H); 7,81 - 7,27 (m, 3H, 7,45, 5-H, 6-H, Ar); 7,17 (t, 1H, Ar). **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 164,6 (C-1'); 160,1 (C-3); 139,6 (C-7a); 128,7 (C-5); 125,2 (C-6); 115,2 (C-7); 112,8 (C-3a); 110,9 (C-4); 141,3 (C, Ar); 134,5 (C, Ar); 131,8 (C, Ar); 130,2 (C, Ar); 127,1 (C, Ar); 119,0 (C, Ar). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 10/90, tg: 6 min., tr: 4,78, [M+H]⁺ = 307,2. **Anal.** (C₁₄H₈Cl₂N₂O₂, 306,00) % experimental (% teórico) C: 54,75 (54,46); H: 2,63 (2,59); N: 9,12 (8,83).

Síntesis de (2,3-difluorofenil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (53, NP106)

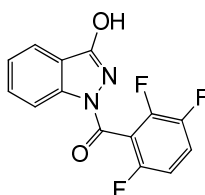
Se realiza a partir de 1 g (7,45 mmol) de 1*H*-indazol-3-ol, 1,14 mL (8,94 mmol) de cloruro de 2,3-difluorobenzoilo y 20 mL de piridina. Tiempo de reacción: 5 h. Rendimiento: 1,81 g (89%).

P.F. = 116–120 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 10,29 (sa, 1H, OH); 7,96 (tc, 1H, 4-H); 7,64 (d, 1H, 7-H); 7,47 - 7,41 (m, 3H, 5-H, Ar); 7,21 - 7,16 (m, 1H, Ar); 7,18 (tt, 1H, 6-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 161,1 (C-1'); 153,3 (C, Ar); 149,3 (C-3); 142,1 (C-7a); 128,3 (C-5); 127,8 (C, Ar); 124,56 (C, Ar); 123,1 (C, Ar); 122,9 (C, Ar); 121,9 (C-6); 119,9 (C-7); 119,6 (C, Ar); 114,3 (C-3a); 110,9 (C-4). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 4,72, [M+H]⁺ = 275,34. **Anal.** (C₁₄H₈F₂N₂O₂, 274,22) % experimental (% teórico) C: 61,32 (61,15); H: 2,94 (3,02); N: 10,22 (10,07).

Síntesis de (3-cloro-2-fluorofenil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (54, NP105)

Se realiza a partir de 562 mg (4,19 mmol) de 1*H*-indazol-3-ol, 1 g (5,02 mmol) de cloruro de 3-cloro-2-fluorobenzoilo y 20 mL de piridina. Tiempo de reacción: 5 h. Rendimiento: 86 mg (7%).

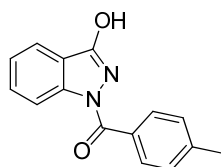
P.F. = 125–128°C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,35 (sa, 1H, OH); 8,39 (d, 1H, 4-H); 7,75 (dd, 4H, 7-H, Ar); 7,49 (td, 1H, 5-H); 7,45 - 7,36 (m, 3H, Ar); 7,40 (t, 1H, 6-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 162,8 (C-1'); 159,9 (C, Ar); 155,7 (C, Ar); 152,4 (C-3); 140,0 (C-7a); 133,0 (C, Ar); 131,2 (C, Ar); 128,9 (C-5); 126,1 (C, Ar); 125,7 (C-6); 121,1 (C-7); 120,1 (C, Ar); 118,9 (C-3a); 115,6 (C-4). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 4.924, [M+H]⁺ = 291,3. **Anal.** (C₁₄H₈ClFN₂O₂, 290,68) % experimental (% teórico) C: 57,85 (57,14); H: 2,77 (2,98); N: 9,64 (9,58).

Síntesis de (2,3,6-trifluorofenil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (55, NP109)

Se realiza a partir de 557 mg (4,15 mmol) de 1*H*-indazol-3-ol, 1 g (4,99 mmol) de cloruro de 2,3,6-trifluorobenzoilo y 20 mL de piridina. Tiempo de reacción: 5 horas. Rendimiento: 631 mg (52%).

P.F. = 120–123 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 9,97 (sa, 1H, OH); 7,67 (d, 1H, 4-H); 7,46 - 7,44 (m, 3H, 7-H, Ar); 7,26 - 7,23 (m, 1H, 5-H), 7,04 (tc, 1H, 6-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 158,5 (C-1'); 149,1 (C-3); 142,1 (C-7a); 128,4 (C-5); 122,1 (C-6); 121,5 (C,Ar); 119,8 (C-7); 114,2 (C-3a); 112,5 (C, Ar); 112,2 (C, Ar); 110,8 (C-4). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 4,78, [M+H]⁺ = 293,31. **Anal.** (C₁₄H₇F₃N₂O₂, 292,21) % experimental (% teórico) C: 56,56 (57,54); H: 2,25 (2,41); N: 9,36 (9,59).

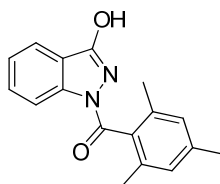
Síntesis de (4-metilfenil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (56, NP74)



Se realiza a partir de 500 mg (2,25 mmol) de 1*H*-indazol-3-ol, 0,5 mL (3,78 mmol) de cloruro de 4-metilbenzoilo y 20 mL de piridina. Tiempo de reacción: 16 h. Rendimiento: 712 mg (76%).

P.F. = 121 - 123 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 10,38 (sa, 1H, OH); 8,20 (d, 1H, Ar); 7,60 (d, 1H, 4-H); 7,40 - 7,29 (m, 4H, 5-H, 7-H, Ar); 7,15 (td, 1H, 6-H); 2,48 (s, 3H, CH₃). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 164,4 (C-1'); 149,6 (C-3); 145,2 (C, Ar); 141,8 (C-7a); 130,8 (C, Ar); 129,6 (C-Ar); 127,8 (C-5); 125,8 (C-Ar); 121,4 (C-6); 119,8 (C-7); 114,3 (C-3a); 110,6 (C-4); 22,0 (CH₃). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 4,97, [M+H]⁺ = 253,2. **Anal.** (C₁₅H₁₂N₂O₂, 252,27) % experimental (% teórico) C: 56,77 (56,56); H: 6,14 (6,25); N: 17,62 (17,36); S: 7,31 (7,95).

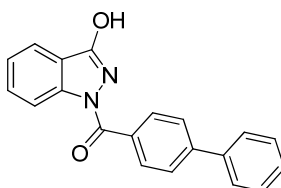
Síntesis de (2,4,6-trimetilfenil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (57, NP90)



Se realiza a partir de 1 g (7,45 mmol) de 1*H*-indazol-3-ol, 1,3 mL (7,83 mmol) de cloruro de 2,4,6-trimetilbenzoilo y 15 mL de piridina. Tiempo de reacción: 4 h. Rendimiento: 1,42 g (68%).

P.F. = 117-120 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,96 (s, 1H, OH); 7,65 (d, 1H, 4-H); 7,60 (d, 1H, 7-H); 7,47 (td, 1H, 5-H); 7,23 (td, 1H, 6-H); 7,07 (s, 2H, Ar); 2,49 (s, 6H, CH₃); 2,33 (s, 3H, CH₃). **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 167,4 (C-1'); 148,0 (C-3); 141,8 (C-7a); 140,5 (C, Ar); 135,6 (C, Ar); 129,3 (C, Ar); 128,9 (C, Ar); 127,4 (C-5); 121,3 (C-6); 119,2 (C-7); 113,6 (C-3a); 111,3 (C-4); 21,1 (CH₃); 20,0 (CH₃). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/95, tg: 9 min., tr: 4.924, [M+H]⁺ = 281,42. **Anal.** (C₂₀H₁₄N₂O₂, 280,32) % experimental (% teórico) C: 73,10 (72,84); H: 5,81 (5,75); N: 9,78 (9,99).

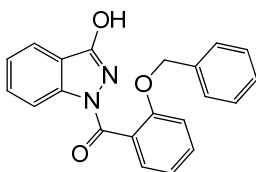
Síntesis de (1,1'-bifenil-4-il)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (58, NP87)



Se realiza a partir de 1 g (7,45 mmol) de 1H-indazol-3-ol, 1,73 g (8,0 mmol) de cloruro de 4-fenilbenzoilo y 20 mL de piridina. Tiempo de reacción: 4 h. Rendimiento: 2,10 g (90%).

P.F. = 128-135 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,94 (s, 1H, OH); 8,30 (d, 2H, Ar); 7,94 (d, 2H, Ar); 7,79 (d, 2H, Ar); 7,61 (d, 1H, 4-H); 7,56 - 7,51 (m, 2H, 7-H, Ar); 7,46 (t, 1H, Ar); 7,43 (t, 1H, 5-H); 7,15 (t, 1H, 6-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 164,1 (C-1'); 148,5 (C-3); 146,2 (c, Ar); 141,7 (C-7a); 139,0 (C, Ar); 131,1 (c, Ar); 129,5 (C, Ar); 129,0 (C, Ar); 127,7 (C, Ar); 127,1 (C, Ar); 127,4 (C-5); 121,3 (C-6); 121,1 (C-7); 119,6 (C-3a); 113,7 (C-4); 111,2 (C, Ar). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/95, tg: 9 min, tr: 5,71, [M+H]⁺ = 315,3. **Anal.** (C₂₀H₁₄N₂O₂, 314,34) % experimental (% teórico) C: 76,60 (76,42); H: 4,52 (4,49); N: 8,76 (8,91).

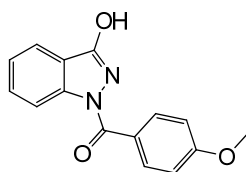
Síntesis de (2-benciloxifenil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (59, NP147)



Se realiza a partir de 1 g (7,45 mmol) de 1H-indazol-3-ol, 2,28 g (8,95 mmol) de cloruro de 2-benciloxibenzoilo y 20 mL de piridina. Tiempo de reacción: 24 h. Rendimiento: 575 mg (22%).

P.F. = 82-87 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 10,60 (sa, 1H, OH); 8,15 (dd, 1H, 4-H); 7,58 - 7,48 (m, 9H, 5-H, 7-H, Ar); 7,14 - 7,08 (m, 3H, 6-H, Ar); 3,49 (CH₂). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 162,0 (C-1'); 158,2 (C-3); 148,2 (C, Ar); 140,5 (C-7a); 135,3 (C, Ar); 133,8 (C, Ar); 131,7 (C, Ar); 127,5 (C, Ar); 127,0 (C, Ar); 126,8 (C-5); 126,0 (C, Ar); 125,8 (C, Ar); 120,4 (C-6); 119,7 (C-7); 118,9 (C, Ar); 117,4 (C-3a); 112,8 (C-4); 109,4 (C, Ar); 69,6 (CH₂). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 5,27, [M+H]⁺ = 345,22. **Anal.** (C₂₁H₁₆N₂O₃, 344,36) % experimental (% teórico) C: 71,24 (71,06); H: 4,68 (4,45); N: 6,13 (6,20).

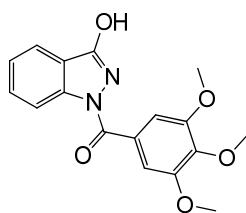
Síntesis de (4-metoxifenil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (60, NP110)



Se realiza a partir de 1 g (7,45 mmol) de 1H-indazol-3-ol, 1,57 g (8,94 mmol) de cloruro de 4-metoxibenzoilo y 20 mL de piridina a una temperatura de -78°C. Tiempo de reacción: 5 h. Rendimiento: 1,96 g (98%).

P.F. = 134–138 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 10,0 (sa, 1H, OH); 8,25 (d, 2H, Ar); 7,59 (d, 1H, 4-H); 7,43 - 7,35 (m, 1H, 7-H, 5-H); 7,16 (tt, 1H, 6-H); 7,02 (d, 2H, Ar); 3,91 (s, 1H, CH₃). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 164,7 (C, Ar); 164,3 (C-1'); 150,2 (C-3); 142,2 (C-7a); 133,2 (C, Ar); 128,1 (C-5); 121,7 (C-6); 121,2 (C, Ar); 120,2 (C-7); 114,8 (C-3a); 114,4 (C, Ar); 110,8 (C-4); 56,0 (CH₃). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 4,82, [M+H]⁺ = 269,40. **Anal.** (C₁₅H₁₂N₂O₃, 268,27) % experimental (% teórico) C: 67,16 (67,40); H: 4,51 (4,60); N: 10,44 (10,18).

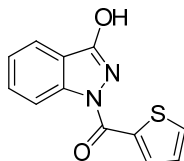
Síntesis de (3,4,5-trimetoxifenil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (61, NP114)



Se realiza a partir de 1 g (7,45 mmol) de 1H-indazol-3-ol, 1,84 g (8,0 mmol) de cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo y 15 mL de piridina. Tiempo de reacción: 4 h. Rendimiento: 1,92 g (79%).

P.F. = 161-165 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 9,96 (s, 1H, OH); 7,60 (d, 1H, 4-H); 7,55 (s, 2H, Ar); 7,44 - 7,41 (m, 1H, 7-H, 5-H); 7,18 (td, 1H, 6-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 164,3 (C-1'); 153,5 (C, Ar); 150,1 (C-3); 143,6 (C, Ar); 142,2 (C-7a); 128,1 (C-5); 123,7 (C, Ar); 121,8 (C-6); 120,2 (C-7); 114,7 (C-3a); 110,8 (C-4) 108,3 (C, Ar); 61,5 (CH₃); 56,8 (2CH₃). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/95, tg: 8 min., tr: 4.74, [M+H]⁺ = 329. **Anal.** (C₁₇H₁₆N₂O₅, 328,32) % experimental (% teórico) C: 62,34 (62,19); H: 5,10 (4,91); N: 8,25 (8,53).

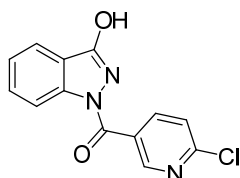
Síntesis de (2-tienil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (62, NP82)



Se realiza a partir de 1 g (7,45 mmol) de 1H-indazol-3-ol, 0,8 mL (7,75 mmol) de cloruro de 2-tienilo y 30 mL de piridina. Tiempo de reacción: 2 h. Rendimiento: 1,15 g (63%).

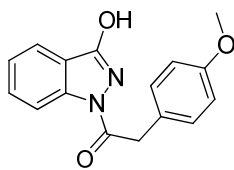
P.F. = 95-100 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,93 (s, 1H, OH); 8,16 (t, 2H, Ar); 7,60 (d, 1H, 4-H); 7,55 (d, 1H, 7-H); 7,43 (t, 1H, 5-H); 7,36 (t, 1H, Ar); 7,15 (t, 1H, 6-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 159,7 (C-1'); 148,0 (C-3); 141,7 (C-7a); 136,4 (C, Ar); 130,9 (C, Ar); 129,3 (C, Ar); 127,5 (C, Ar); 127,5 (C-5); 121,1 (C-6); 119,4 (C-7); 113,6 (C-3a); 111,2 (C-4). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo/ agua 15/95, tg: 9 min, tr: 4,68, [M+H]⁺ = 245,07. **Anal.** (C₁₂H₈N₂O₂S, 244,27) % experimental (% teórico) C: 58,87 (59,00); H: 3,28 (3,30); N: 11,31 (11,47).

Síntesis de (4-cloro-3-piridil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (63, NP85)



Se realiza a partir de 1,25 g (9,33 mmol) de 1H-indazol-3-ol, 1,76 g (13,6 mmol) de cloruro de 2-cloro-5-piridilcarbonilo y 20 mL de piridina. Tiempo de reacción: 5 h. Rendimiento: 2,19 g (86%).

P.F. = 122-125 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,96 (s, 1H, OH); 9,18 (d, 1H, Ar); 8,56 (dd, 1H, Ar); 7,79 (d, 1H, Ar); 7,65 (d, 1H, 4-H); 7,55 (d, 1H, 7-H); 7,43 (t, 1H, 5-H); 7,14 (t, 1H, 6-H). **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 162,8 (C-1'); 155,8 (C, Ar); 151,8 (C, Ar); 147,9 (C-3); 141,7 (C-7a); 141,4 (C, Ar); 127,5 (C-5); 125,3 (C, Ar); 124,2 (C, Ar); 121,1 (C-6); 119,7 (C-7); 113,4 (C-3a); 111,2 (C-4). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/95, tg: 8 min, tr: 4,52, [M+H]⁺ = 274,3. **Anal.** (C₁₃H₈ClN₃O₂, 273,68) % experimental (% teórico) C: 57,17 (57,05); H: 2,91 (2,95); N: 15,48 (15,35).

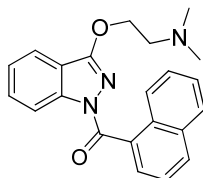
Síntesis de (4-metoxibencil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (64, NP122)

Se realiza a partir de 1 g (7,45 mmol) de 1*H*-indazol-3-ol, 1,41 mL (8,57 mmol) de cloruro de 2-(4-metoxifenil)acetilo y 30 mL de THF anhidro. Precipita un sólido blanco que se aísla por filtración y se lava con acetona. Tiempo de reacción: 2,5 h. Rendimiento: 1,041 g (49%).

P.F. = 97 - 99 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,16 (s, 1H, OH); 7,89 (d, 1H, 4-H); 7,60 (t, 1H, 7-H); 7,32 (d, 2H, Ar); 7,16 - 7,11 (m, 2H, 5-H, 6-H); 6,87 (d, 2H, Ar); 4,43 (s, 2H, 2'-H); 3,79 (s, 3H, OCH₃). **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167,3 (C-1'); 160,85 (C-6'); 158,6 (C-3); 147,4 (C-7a); 135,3 (C-5); 131,1 (2C, C-4'); 126,2 (C-3'); 124,9 (C-6); 121,7 (C-7); 115,9 (C-3a); 114,1 (2C, C-5'); 112,6 (C-4); 55,4 (OCH₃); 39,0 (C-2'). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 15/95, tg: 5 min, tr: 4,45, [M+H]⁺ = 283. **Anal.** (C₁₃H₈ClN₃O₂, 282,29) % experimental (% teórico) C: 68,07 (67,96); H: 5,00 (5,17); N: 9,92 (9,87).

8.1.2.2. Síntesis de los derivados de 1*H*-indazol-3-ol sustituidos en posiciones N1 y O3

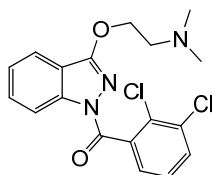
Procedimiento general. Se suspende el derivado de R-3-indazolol N1 sustituido y K₂CO₃ en 2-butanona. A continuación, se adiciona el haluro correspondiente y KI en cantidades catalíticas. La mezcla se lleva a reflujo y, una vez terminada la reacción, se deja enfriar y se evapora el disolvente a vacío. El crudo de reacción se disuelve en cloroformo y se extrae con agua. La fase orgánica se lleva a sequedad y se purifica en cada caso. Las condiciones de reacción y purificación se describen para cada compuesto de manera individual.

Síntesis de (1-naftil)(3-(2-dimetilaminoetoxi)indazol-1-il)cetona (14, NP76)

Se realiza a partir de 209 mg (0,72 mmol) de **47 (NP77)**, 115 mg (1,8 mmol) de hidrócloruro de 1-(2-cloroetil)dimetilamina, 489 mg (1,5 mmol) de Cs₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 25 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 43 h. Rendimiento: 85 mg (33%).

Aceite. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,55 (d, 1H, 4-H); 7,98 (d, 1H, 7-H); 7,94 - 7,89 (m, 2H, Ar); 7,75 (td, 2H, Ar); 7,64 (td, 1H, 5-H); 7,52 - 7,49 (m, 3H, Ar); 7,40 (td, 1H, 6-H); 4,24 (t, 2H, 1''-H); 2,63 (t, 2H, 2''-H); 2,22 (s, 6H, 4-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 168,8 (C-1'); 160,0 (C-3); 141,6 (C-7a); 133,7 (C, Ar); 133,1 (C, Ar); 131,1 (C, Ar); 130,9 (C, Ar); 128,7 (C-5); 127,8 (C, Ar); 127,2 (C, Ar); 126,5 (C, Ar); 126,0 (C, Ar); 125,1 (C, Ar); 125,0 (C, Ar); 124,9 (C-6); 120,5 (C-7); 118,5 (C-3a); 116,6 (C-4); 67,2 (C-1'); 57,8 (C-2'); 45,8 (C-4'). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 2,92, [M+H]⁺ = 360,38. **Anal.** (C₂₂H₂₁N₃O₂, 359,42) % experimental (% teórico): C: 73,52 (73,31); H: 5,89 (5,74); N: 11,69 (11,48).

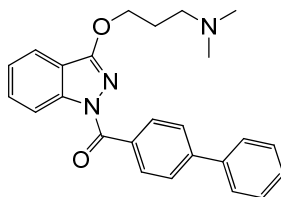
Síntesis de (2,3-diclorofenil)(3-(2-dimetilaminoetoxi)indazol-1-il) cetona (15, NP113)



Se realiza a partir de 253 mg (0,82 mmol) de **52 (NP44)**, 150 mg (0,95 mmol) de hidrócloruro de 1-(2-cloroetil)dimetilamina, 465 mg (3,36 mmol) de K₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 46 h. Rendimiento: 122 mg (39%).

P.F. = 212-215 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,51 (d, 1H, 4-H); 7,75 (d, 1H, 7-H); 7,67 (t, 1H, 5-H); 7,60 (dd, 1H, Ar); 7,46 - 7,41 (m, 2H, Ar); 7,36 (t, 1H, 6-H); 4,77 (t, 2H, 1''-H); 3,45 (d, 2H, 2''-H); 2,87 (s, 6H, 4-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 165,5 (C-1'); 159,4 (C-3); 141,2 (C-7a); 137,5 (C, Ar); 133,6 (C, Ar); 132,3 (C, Ar); 131,7 (C, Ar); 130,1 (C, Ar); 128,2 (C, Ar); 127,6 (C-5); 125,9 (C-6); 120,8 (C-7); 117,8 (C-3a); 116,5 (C-4); 64,0 (C-1''); 55,9 (C-2''); 43,9 (C-4'). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 3,06, [M+H]⁺ = 378. **Anal.** (C₁₈H₁₇Cl₂N₃O₂, 378,25) % experimental (% teórico): C: 53,16 (52,66); H: 4,53 (3,77); N: 10,11 (9,98).

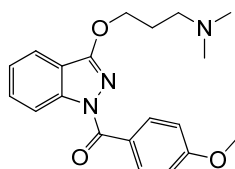
Síntesis de (1,1'-bifenil-4-il)(3-(3-dimetilaminopropoxi)indazol-1-il) cetona (16, NP123)



Se realiza a partir de 250 mg (0,81 mmol) de **58 (NP87)**, 158,1 mg (0,95 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)dimetilamina, 224 mg (1,62 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 24 h. Rendimiento: 41 mg (13%).

Aceite. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,56 (d, 1H, 4-H); 8,22 (d, 2H, Ar); 7,69 - 7,67 (m, 5H, Ar); 7,49 (t, 2H, Ar); 7,73 - 7,36 (m, 3H, 5-H, 6-H, 7-H); 4,49 (t, 2H, 1''-H); 2,58 (t, 2H, 3''-H); 2,33 (s, 6H, 5-H''); 2,14 - 2,09 (m, 2H, 2''-H). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 167,5 (C-1'); 160,1 (C-3); 142,1 (C-7a); 131,9 (C, Ar); 130,8 (C-5); 129,3 (C, Ar); 127,7 (C, Ar); 126,9 (C, Ar); 124,9 (C-6); 120,2 (C-7); 118,1 (C-3a); 116,9 (C-4); 68,1 (C-1''); 56,6 (C-3''); 45,6 (C-5''); 27,3 (C-2''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,33, $[M+H]^+ = 401$. **Anal.** ($C_{25}H_{25}N_3O_2$, 399,48) % experimental (% teórico): C: 75,16 (75,40); H: 6,31 (6,30); N: 10,52 (10,24).

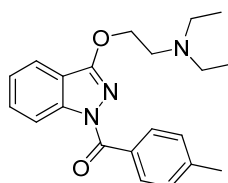
Síntesis de (4-metoxifenil)(3-(3-dimetilaminopropoxi)indazol-1-il) cetona (17, NP125)



Se realiza a partir de 250 mg (0,93 mmol) de **60 (NP110)**, 368 mg (2,23 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)dimetilamina, 386 mg (2,79 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica posteriormente por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 72 h. Rendimiento: 18 mg (5%).

Aceite. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,52 (d, 1H, 4-H); 8,18 (d, 2H, Ar); 7,71 (d, 1H, 7-H); 7,59 (t, 1H, 5-H); 7,35 (t, 1H, 6-H); 6,98 (d, 2H, Ar); 4,48 (t, 2H, 1''-H); 3,90 (s, 3H, OCH_3); 2,70 (t, 2H, 3''-H); 2,40 (s, 6H, 5-H''); 2,19 - 2,10 (m, 2H, 2''-H). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 161,5 (C-1'); 158,3 (C-3); 140,8 (C-7a); 132,3 (C, Ar); 129,2 (C-5); 124,8 (C, Ar); 123,2 (C-6); 118,6 (C-7); 116,3 (C-3a); 115,4 (C-4); 112,1 (C, Ar); 66,4 (C-1''); 54,5 (C-3''); 54,4 (CH_3); 43,3 (C-5''); 25,09 (C-2''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,45, $[M+H]^+ = 354$. **Anal.** ($C_{20}H_{23}N_3O_3$, 353,41) % experimental (% teórico): C: 67,97 (68,12); H: 6,56 (6,69); N: 11,89 (11,11).

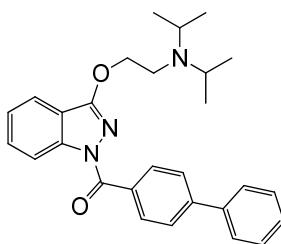
Síntesis de (4-metilfenil)(3-(2-dietilaminoetoxi)indazol-1-il) cetona (18, NP75)



Se realiza a partir de 260 mg (1,031 mmol) de **56 (NP74)**, 200 mg (1,162 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)diethylamina, 721 mg (2,211 mmol) de Cs₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 76 h. Rendimiento: 70 mg (25%).

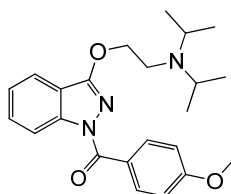
Aceite. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,53 (dd, 1H, 4-H); 8,06 (d, 2H, Ar); 7,71 (d, 1H, 7-H); 7,62 (td, 1H, 5-H); 7,39 (td, 1H, 6-H); 7,33 (d, 2H, Ar); 4,56 (t, 2H, 1''-H); 3,03 (t, 2H, 2''-H); 2,74 (c, 4H, 4-H''); 2,48 (s, 3H, 6-H'); 1,13 (t, 6H, 5-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 167,3 (C-1'); 159,4 (C-3); 142,2 (C, Ar); 141,7 (C-7a); 131,0 (C, Ar); 130,8 (C-5); 128,4 (C, Ar); 124,3 (C-6); 119,7 (C-7); 117,5 (C-3a); 116,3 (C-4); 67,5 (C-1'); 50,9 (C-2''); 47,8 (C-4''); 21,6 (C-6'); 11,6 (C-5''). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,01, [M+H]⁺ = 352,48. **Anal.** (C₂₁H₂₅N₃O₂, 351,44) % experimental (% teórico): C: 71,52 (71,38); H: 5,67 (5,90); N: 11,18 (10,82).

Síntesis de (1,1'-bifenil-4-il)(3-(2-diisopropilaminoetoxi)indazol-1-il) cetona (19, NP89)



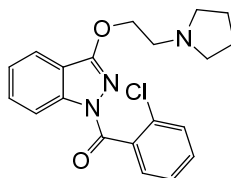
Se realiza a partir de 400 mg (1,28 mmol) de **58 (NP87)**, 279 mg (1,5 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)diisopropilamina, 977 mg (3,00 mmol) de Cs₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 25 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 22 h. Rendimiento: 155 mg (27%).

Aceite. **¹H-RMN** (300MHz, CDCl₃) δ: 8,60 (d, 1H, 4-H); 8,25 (d, 2H, Ar); 7,77 - 7,63 (m, 7H, Ar, 7-H); 7,54 (t, 1H, 5-H); 7,47 - 7,43 (m, 2H, 6-H, Ar); 4,75 (t, 2H, 1''-H); 3,15 (t, 2H, 2''-H); 2,80 (s, 4H, 4-H''); 1,87 (s, 4H, 5-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 165,5 (C-1'); 160,0 (C-3); 144,0 (C, Ar); 142,0 (C, Ar); 141,0 (C-7a); 133,0 (C, Ar); 132,0 (C, Ar); 131,0 (C, Ar); 129,0 (C, Ar); 128,0 (C-5); 127,0 (C, Ar); 126,0 (C, Ar); 125,0 (C-6); 20,0 (C-7); 118,0 (C-3a); 117,0 (C-4); 70,0 (C-1''); 50,0 (C-2''); 44,0 (C-4''); 21,0 (C-5''). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 3,60, [M+H]⁺ = 442,43. **Anal.** (C₂₈H₃₁N₃O₂, 441,57) % experimental (% teórico): C: 76,16 (76,31); H: 7,08 (6,74); N: 9,52 (9,71).

Síntesis de (4-metoxifenil)(3-(2-diisopropilaminoetoxi)indazol-1-il) cetona (20, NP117)

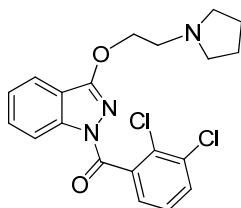
Se realiza a partir de 250 mg (0,93 mmol) de **60 (NP110)**, 210 mg (1,05 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)diisopropilamina, 1,805 mg (13,1 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 46 h. Rendimiento: 123 mg (33%).

Aceite. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,52 (d, 1H, 4-H); 8,18 (d, 2H, Ar); 7,70 (d, 1H, 7-H); 7,59 (t, 1H, 5-H); 7,35 (t, 1H, 6-H); 6,97 (d, 2H, Ar); 4,35 (t, 2H, 1''-H); 3,90 (s, 3H, OCH_3); 3,07 - 3,01 (m, 2H, 2''-H); 2,89 (t, 2H, 4-H''); 1,02 (s, 12H, 5-H'). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 165,7 (C, Ar); 161,4 (C-1'); 158,5 (C-3); 140,8 (C-7a); 132,3 (C, Ar); 129,2 (C-5); 124,9 (C, Ar); 123,1 (C-6); 118,7 (C-7); 116,6 (C-3a); 115,4 (C-4); 112,1 (C, Ar); 69,2 (C-1''); 54,4 (OCH_3); 48,6 (C-2''); 42,9 (C-4''); 19,8 (C-5''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 2,98, $[M+H]^+ = 397$. **Anal.** ($C_{23}H_{29}N_3O_3$, 395,50) % experimental (% teórico): C: 69,58 (70,10); H: 7,39 (7,60); N: 10,62 (10,87).

Síntesis de (2-clorofenil)(3-(2-pirrolidiniletoxi)indazol-1-il)cetona (21, NP104)

Se realiza a partir de 500 mg (1,83 mmol) de **51 (NP102)**, 338 mg (2,00 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)pirrolidina, 887 mg (6,41 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 30 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (50:1). Tiempo de reacción: 18 h. Rendimiento: 320 mg (48%).

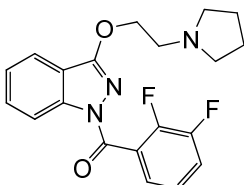
Aceite. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,50 (d, 1H, 4-H); 7,72 (d, 1H, 7-H); 7,62 (t, 1H, 5-H); 7,52 (dd, 1H, Ar); 7,44 - 7,40 (m, 4H, 6-H, Ar); 4,39 (t, 2H, 1''-H); 2,89 (t, 2H, 2''-H); 2,57 (s, 4H, 4-H''); 1,79 - 1,75 (m, 4H, 5-H'). **^{13}C -RMN** (MHz, $CDCl_3$) δ : 166,2 (C-1'); 140,7 (C-3); 135,3 (C-7a); 130,8 (C, Ar); 130,4 (C, Ar); 129,6 (C, Ar); 129,3 (C-5); 126,3 (C, Ar); 124,8 (C-6); 119,9 (C-7); 118,4 (C-3a); 115,9 (C-4); 63,4 (C-1''); 54,6 (C-4''); 54,4 (C-2''); 23,5 (C-5''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 2,81, $[M+H]^+ = 370$. **Anal.** ($C_{20}H_{20}ClN_3O_2$, 369,84) % experimental (% teórico): C: 64,95 (65,24); H: 5,45 (5,71); N: 11,36 (11,42).

Síntesis de (2,3-diclorofenil)(3-(2-pirrolidiniletoxi)indazol-1-il)cetona (22, NP43)

Se realiza a partir de 154 mg (0,50 mmol) de **52 (NP44)**, 86 mg (0,51 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)pirrolidina, 135,4 mg (0,98 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 25 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna con la mezcla de disolventes agua : metanol (50:1). Tiempo de reacción: 16 h. Rendimiento: 173 mg (86%).

Aceite. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,50 (d, 1H, 4-H); 7,71 (d, 1H, 7-H); 7,63 (t, 1H, 5-H); 7,57 (dd, 1H, Ar); 7,42 - 7,37 (m, 2H, Ar); 7,31 (t, 1H, 6-H); 4,38 (t, 2H, 1''-H); 2,88 (t, 2H, 2''-H); 2,56 (s, 4H, 4-H''); 1,86 - 1,75 (m, 4H, 5-H''). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 165,3 (C-1'); 160,3 (C-3); 140,6 (C-7a); 137,5 (C, Ar); 133,3 (C, Ar); 131,4 (C, Ar); 130,6 (C-5); 127,2 (C-6); 127,0 (C, Ar); 125,0 (C, Ar); 120,1 (C-7); 118,5 (C-3a); 116,0 (C-4); 68,5 (C-1''); 54,7 (C-4''); 54,3 (C-2''); 23,5 (C-5'').

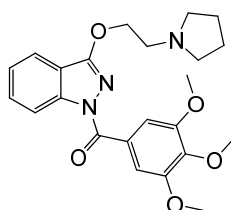
HPLC-MS (ES+): acetonitrilo / agua 10/90, tg: 7 min., tr: 2,93, $[M+H]^+ = 404,10$. **Anal.** ($C_{20}H_{19}Cl_2N_3O_3$, 403,09) % experimental (% teórico): C: 59,42 (59,63); H: 4,74 (5,01); N: 10,39 (10,11); Cl: 17,54 (16,17).

Síntesis de (2,3-difluorofenil)(3-(2-pirrolidiniletoxi)indazol-1-il)cetona (23, NP107)

Se realiza a partir de 150 mg (0,55 mmol) de **53 (NP106)**, 74,6 mg (0,55 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)pirrolidina, 152 mg (1,1 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 72 h. Rendimiento: 82 mg (40%).

Aceite. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,49 (d, 1H, 4-H); 7,73 (d, 1H, 7-H); 7,62 (td, 1H, 5-H); 7,39 - 7,16 (m, 4H, 6-H, Ar); 4,45 (t, 2H, 1''-H); 2,93 (t, 2H, 2''-H); 2,62 (s, 4H, 4-H''); 1,80 (s, 4H, 5-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 163,8 (C-1'); 160,6 (C-3); 152,4 (C, Ar); 149,1 (C, Ar); 146,7 (C, Ar); 141,2 (C-7a); 130,9 (C-5); 125,4 (C-6); 124,4 (C, Ar); 120,5 (C-7); 120,0 (C, Ar); 119,8 (C, Ar); 118,9 (C-3a); 116,4 (C-4); 68,9 (C-1''); 55,0 (C-2''); 54,8 (C-4''); 23,9 (C-5''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 2,93, [M+H]⁺ = 272. **Anal.** (C₂₀H₁₉F₂N₃O₂, 371,38) % experimental (% teórico): C: 64,68 (64,41); H: 5,16 (5,37); N: 11,31 (11,20).

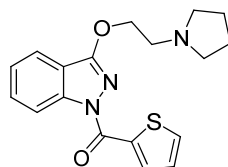
Síntesis de (3,4,5-trimetoxifenil)(3-(2-pirrolidiniletoxi)indazol-1-il) cetona (24, NP116)



Se realiza a partir de 250 mg (0,76 mmol) de **61 (NP114)**, 145 mg (0,85 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)pirrolidina, 1,75 g (12,6 mmol) de K₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 60 mL de acetona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 48 h. Rendimiento: 229 mg (71%).

P.F. = 78-81 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,49 (d, 1H, 4-H); 7,73 (d, 1H, 7-H); 7,61 (t, 1H, 5-H); 7,52 (s, 2H, Ar); 7,37 (t, 1H, 6-H); 4,58 (t, 2H, 1''-H); 3,93 (s, 6H, OCH₃); 3,95 (s, 3H, OCH₃); 3,00 (t, 2H, 2''-H); 2,68 - 2,64 (m, 4H, 4-H''); 1,84 - 1,79 (m, 4H, 5-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 165,4 (C-1'); 158,7 (C-3); 151,4 (C, Ar); 140,9 (C, Ar); 140,4 (C-7a); 129,4 (C-5); 127,3 (C, Ar); 123,4 (C-6); 118,9 (C-7); 116,5 (C-3a); 115,4 (C-4); 107,9 (C, Ar); 67,6 (C-1''); 59,9 (C-2''); 55,2 (C-4''); 53,7 (3CH₃); 22,5 (C-5''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 2,91, [M+H]⁺ = 426. **Anal.** (C₂₃H₂₇N₃O₅, 425,48) % experimental (% teórico): C: 64,9 (64,6); H: 6,40 (6,68); N: 9,88 (9,75).

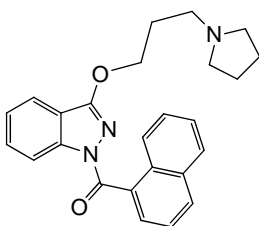
Síntesis de (2-tienil)(3-(2-pirrolidiniletoxi)indazol-1-il)cetona (25, NP83)



Se realiza a partir de 197 mg (0,81 mmol) de **62 (NP82)**, 153 mg (0,90 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)pirrolidina, 489 mg (1,5 mmol) de Cs₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 3 h. Rendimiento: 45 mg (16%).

P.F. = 53-59 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,51 (dd, 1H, 4-H); 8,34 (d, 1H, 7-H); 7,73 - 7,70 (m, 2H, Ar); 7,58 (td, 1H, 5-H); 7,33 (td, 1H, 6-H); 7,18 (dd, 1H, Ar); 4,76 (t, 2H, 1''-H); 3,15 (t, 2H, 2''-H); 2,79 (s, 4H, 4-H''); 1,87 (s, 4H, 5-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 160 (C-1'); 159 (C-3); 142 (C-7a); 136 (C, Ar); 134 (C, Ar); 127 (C, Ar); 125 (C, Ar); 125,0 (C-5); 127,0 (C-6); 120 (C-7); 118 (C-3a); 117 (C-4); 67 (C-1''); 55 (C-2''); 54 (C-4''); 24 (C-5''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 2,92, [M+H]⁺ = 342,41. **Anal.** (C₂₉H₂₈N₂O₂, 341,43) % experimental (% teórico): C: 63,32 (63,14); H: 5,61 (5,55); N: 12,31 (12,08).

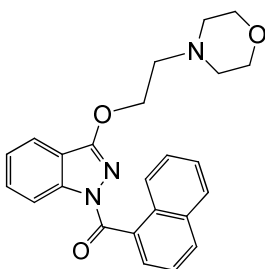
Síntesis de (1-naftil)(3-(3-pirrolidinilpropoxi)indazol-1-il)cetona (26, NP154)



A partir de 200 mg (0,69 mmol) de **47 (NP77)**, 123 mg (0,83 mmol) de hidrocloreuro de 1-(3-cloropropil)pirrolidina, 288 mg (2,08 mmol) de K₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (85:15). Tiempo de reacción: 48 h. Rendimiento: 52,1 mg (19%).

Aceite. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,54 (sa, 1H, 4-H); 8,00 - 7,88 (m, 3H, Ar); 7,78 - 7,69 (m, 2H, 7-H, Ar); 7,63 (t, 1H, 5-H); 7,57 - 7,44 (m, 3H, Ar); 7,39 (t, 1H, 6-H); 4,17 (t, 2H, 1''-H); 2,53 (t, 2H, 3''-H); 2,50 (s, 4H, 5-H''); 1,97 - 1,88 (m, 2H, 2''-H); 1,75 (s, 4H, 6-H''); 1,45 (d, 2H, 7-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 167,3 (C-1'); 158,7 (C-3); 140,1 (C-7a); 132,3 (C, Ar); 131,6 (C, Ar); 129,6 (C, Ar); 129,4 (C, Ar); 127,3 (C-5); 126,4 (C, Ar); 126,3 (C, Ar); 125,8 (C, Ar); 125,1 (C, Ar); 124,5 (C, Ar); 123,6 (C, Ar); 123,4 (C-6); 118,9 (C-7); 117,2 (C-3a); 115,3 (C-4); 66,7 (C-1''); 52,9 (C-5''); 51,2 (C-3''); 26,7 (C-2''); 22,3 (C-6''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,72, [M+H] = 400,31. **Anal.** (C₂₅H₂₅N₃O₂, 399,5) % experimental (% teórico): C: 70,16 (68,58); H: 6,31 (5,93); N: 10,52 (9,75).

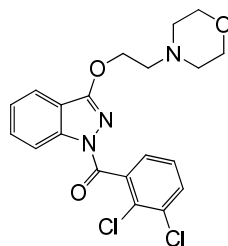
Síntesis de (1-naftil)(3-(2-morfolinoetoxi)indazol-1-il)cetona (27, NP100)



Se realiza a partir de 150 mg (0,52 mmol) de **47 (NP77)**, 97,8 mg (0,52 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)morfolina, 215 mg (1,52 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 96 h. Rendimiento: 48 mg (23%).

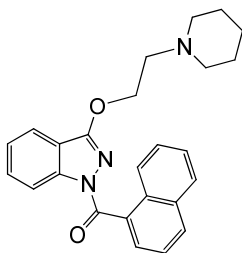
Aceite. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,56 (d, 1H, 4-H); 7,98 (d, 1H, 7-H); 7,93 - 7,90 (m, 2H, Ar); 7,77 - 7,70 (m, 3H, Ar); 7,65 (t, 1H, 5-H); 7,54 - 7,47 (m, 2H, Ar); 7,41 (t, 1H, 6-H); 4,26 (t, 2H, 1''-H); 3,62 - 3,59 (m, 4H, 5-H''); 2,61 (t, 2H, 2''-H); 2,36 - 2,33 (m, 4H, 4-H''). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 167,4 (C-1'); 158,5 (C-3); 140,1 (C-7a); 132,3 (C, Ar); 131,7 (C, Ar); 129,6 (C, Ar); 124,4 (C, Ar); 127,2 (C-5); 126,2 (C, Ar); 125,8 (C, Ar); 125,1 (C, Ar); 124,5 (C, Ar); 123,7 (C, Ar); 123,4 (C-6); 118,9 (C-7); 117,1 (C-3a); 115,2 (C-4); 65,7 (C-5''); 65,5 (C-1''); 55,7 (C-2''); 52,7 (C-4'). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 3, $[M+H]^+ = 402$. **Anal.** ($C_{24}H_{23}N_3O_3$, 401,46) % experimental (% teórico): C: 71,80 (71,52); H: 5,77 (5,67); N: 10,47 (11,18).

Síntesis de (2,3-diclorofenil)(3-(2-morfolinoetoxi)indazol-1-il) cetona (28, NP121)



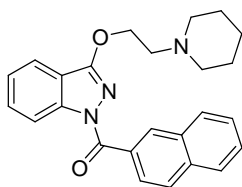
Se realiza a partir de 250 mg (0,81 mmol) de **52 (NP44)**, 365,4 mg (1,94 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)morfolina, 224 mg (1,62 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 48 h. Rendimiento: 24 mg (7%).

P.F. = 113-114 °C. **1H -RMN** ($CDCl_3$) δ : 8,52 (d, 1H, 4-H); 7,71 (d, 1H, 7-H); 7,64 (t, 1H, 5-H); 7,58 (dd, 1H, Ar); 7,43 - 7,38 (m, 2H, Ar); 7,32 (t, 1H, 6-H); 4,38 (t, 2H, 1''-H); 3,70 - 3,67 (m, 4H, 5-H''); 2,78 (t, 2H, 2''-H); 2,51 (s, 4H, 4-H''). **^{13}C -RMN** ($CDCl_3$) δ : 164,2 (C-1'); 159,1 (C-3); 139,6 (C-7a); 136,5 (C, Ar); 132,2 (C, Ar); 130,4 (C, Ar); 129,6 (C, Ar); 126,3 (C, Ar); 126,1 (C-5); 124,1 (C-6); 118,9 (C-7); 117,4 (C-3a); 115,0 (C-4); 65,8 (C-1''); 55,8 (C-5''); 52,9 (C-2'', C-4''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tr: 3,06, $[M+H]^+ = 420$. **Anal.** ($C_{20}H_{19}Cl_2N_3O_3$, 420,29) % experimental (% teórico): C: 57,15 (56,98); H: 4,56 (4,62); N: 10,05 (9,71).

Síntesis de (1-naftil)(3-(2-piperidinoetoxi)indazol-1-il)cetona (29, NP152)

Se realiza a partir de 250 mg (0,87 mmol) de **47 (NP77)**, 195,5 mg (1,04 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloroetil)piperidina, 361 mg (2,61 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (98:2). Tiempo de reacción: 24h. Rendimiento: 124 mg (36%).

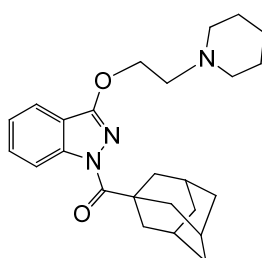
Aceite. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,58 (sa, 1H, 4-H); 7,99 (d, 1H, Ar); 7,90 (t, 2H, Ar); 7,77 - 7,63 (m, 3H, 5-H, 7-H, Ar); 7,59 7,46 (m, 3H, Ar); 7,46 (t, 1H, 6-H); 4,41 (t, 2H, 1''-H); 2,81 (t, 2H, 2''-H); 2,51 (s, 4H, 4-H''); 1,67 (s, 4H, 5-H''); 1,45 (s, 2H, 6-H''). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 167,4 (C-1'); 158,1 (C-3); 140,2 (C-7a); 132,2 (C, Ar); 131,7 (C, Ar); 129,5 (C, Ar); 127,3 (C-5); 126,3 (C-6); 125,8 (C, Ar); 125,1 (C, Ar); 124,5 (C, Ar); 123,8 (C, Ar); 123,6 (C, Ar); 118,9 (C-7); 116,8 (C-3a); 115,2 (C-4); 64,5 (C-1''); 55,0 (C-2''); 53,2 (C-4''); 23,4 (C-5''); 22,1 (C-6''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 3,07, $[M+H] = 400,31$. **Anal.** ($C_{25}H_{25}N_3O_2$, 399,48) % experimental (% teórico): C: 65,16 (66,78); H: 5,31 (5,19); N: 9,52 (8,69).

Síntesis de (2-naftil)(3-(2-piperidinoetoxi)indazol-1-il)cetona (30, NP73)

Se realiza a partir de 150 mg (0,52 mmol) de **49 (NP47)**, 98 mg (0,53 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)piperidina, 342 mg (1,04 mmol) de Cs_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 25 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 18 h. Rendimiento: 95 mg (46%).

Aceite. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,54 (s, 1H, 4-H); 8,42 (d, 1H, Ar); 8,01 (d, 1H, Ar); 7,82 - 7,73 (m, 3H, 7-H, Ar); 7,57 (d, 1H, Ar); 7,48 - 7,38 (m, 3H, 5-H, Ar); 7,21 (t, 1H, 6-H); 4,40 (t, 2H, 1''-H); 2,71 (t, 2H, 2''-H); 2,37 (s, 4H, 4-H'); 1,46 - 1,42 (m, 4H, 5-H'); 1,28 (6-H'). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 167,7 (C-1'); 160,1 (C-3); 142,1 (C-7a); 135,2 (C, Ar); 132,7 (C, Ar); 131,5 (C, Ar); 130,8 (C, Ar); 129,8 (C, Ar); 128,4 (C-5); 128,1 (C, Ar); 127,6 (C, Ar); 127,4 (C, Ar); 126,9 (C, Ar); 124,9 (C-6); 120,3 (C-7); 118,1 (C-3a); 116,8 (C-4); 67,7 (C-1''); 57,8 (C-2''); 55,3 (C-4''); 26,2 (C-5'); 24,5 (C-6''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 3,28, [M+H]⁺ = 400,32. **Anal.** (C₂₅H₂₅N₃O₂, 399,48) % experimental (% teórico): C: 75,16 (74,95); H: 6,31 (6,52); N: 10,52 (10,57).

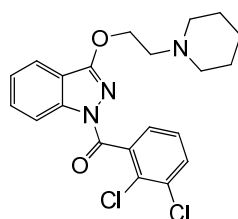
Síntesis de (1-adamantil)(3-(2-piperidinoetoxi)indazol-1-il)cetona (31, NP93)



Se realiza a partir de 200 mg (0,68 mmol) de **50 (NP80)**, 147 mg (0,8 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)piperidina, 660 mg (2,02 mmol) de Cs₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 66 h. Rendimiento: 213 mg (77%).

P.F. = 108-110 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,42 (d, 1H, 4-H); 7,65 (d, 1H, 7-H); 7,52 (td, 1H, 5-H); 7,29 (td, 1H, 6-H); 4,64 (t, 2H, 1''-H); 2,94 (t, 2H, 2''-H); 2,61 (s, 4H, 4-H'); 2,35 (s, 6H, CH₂); 2,09 (s, 3H, CH); 1,80 (s, 6H, CH₂); 1,67 - 1,64 (m, 4H, 5-H'); 1,48 (d, 2H, 6-H'). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 175,7 (C-1'); 157,0 (C-3); 140,9 (C-7a); 129,1 (C-5); 122,8 (C-6); 118,4 (C-7); 115,4 (C-3a); 115,6 (C-4); 66,3 (C-1''); 56,4 (C-2''); 54,0 (C-4''); 42,9 (C-2'); 37,5 (C-3'); 35,8 (C-4'); 27,4 (C-5'); 24,8 (C-5''); 23,0 (C-6''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15:85, tg: 6 min., tr: 3,46, [M+H]⁺ = 408,6. **Anal.** (C₂₅H₃₃N₃O₂, 407,55) % experimental (% teórico): C: 73,68 (73,50); H: 8,16 (8,13); N: 10,31 (10,18).

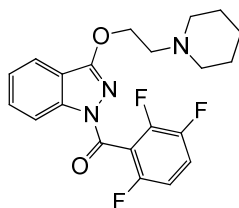
Síntesis de (2,3-diclorofenil)(3-(2-piperidinoetoxi)indazol-1-il)cetona (32, NP101)



Se realiza a partir de 150 mg (0,49 mmol) de **52 (NP44)**, 91,75 mg (0,49 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)piperidina, 135,4 mg (0,98 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 48 h. Rendimiento: 36,2 mg (18%).

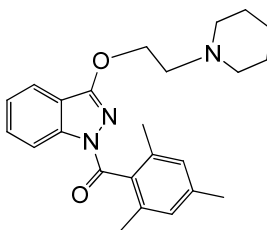
P.F. = 118-121 °C. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,51 (d, 1H, 4-H); 7,69 (d, 1H, 7-H); 7,63 (t, 1H, 5-H); 7,57 (dd, 1H, Ar); 7,40 (td, 2H, Ar); 7,31 (td, 1H, 6-H); 4,37 (t, 2H, 1''-H); 2,75 (t, 2H, 2''-H); 2,43 (d, 4H, 4-H''); 1,56 - 1,54 (m, 4H, 5-H''); 1,44 - 1,42 (m, 2H, 6-H''). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 164,3 (C-1'); 159,2 (C-3); 139,6 (C-7a); 136,5 (C, Ar); 132,2 (C, Ar); 130,4 (C, Ar); 129,5 (C, Ar); 129,0 (C, Ar); 126,0 (C-5); 124,0 (C-6); 119,0 (C-7); 117,5 (C-3a); 114,9 (C-4); 66,2 (C-1''); 56,0 (C-2''); 53,8 (C-4''); 24,8 (C-5''); 23,1 (C-6''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,10, $[M+H]^+ = 418$. **Anal.** ($C_{20}H_{19}Cl_2N_3O_2$, 404,3) % experimental (% teórico): C: 60,30 (59,70); H: 5,06 (5,01); N: 10,05 (10,10).

Síntesis de (2,3,6-trifluorofenil)(3-(2-piperidinoetoxi)indazol-1-il) cetona (**33, NP111**)



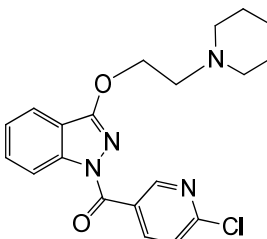
Se realiza a partir de 250 mg (0,86 mmol) de **55 (NP109)**, 184 mg (1,0 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)piperidina, 465 mg (3,36 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 66 h. Rendimiento: 82 mg (24%).

P.F. = 105-107 °C. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,50 (d, 1H, 4-H); 7,72 (d, 1H, 7-H); 7,64 (t, 1H, 5-H); 7,41 (t, 1H, 6-H); 7,35 - 7,26 (m, 1H, Ar); 6,97 - 6,91 (m, 1H, Ar); 4,40 (t, 2H, 1''-H); 2,77 (t, 2H, 2''-H); 2,46 (t, 4H, 4-H''); 1,59 - 1,55 (m, 4H, 5-H''); 1,44 - 1,42 (m, 2H, 6-H''). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 160,9 (C-1'); 159,1 (C-3); 156,8 (C, Ar); 153,5 (C, Ar); 148,8 (C, Ar); 145,7 (C, Ar); 140,9 (C-7a); 131,1 (C-5); 125,7 (C-6); 120,6 (C-7); 119,2 (C-3a); 119,0 (C, Ar); 116,4 (C-4); 111,3 (C, Ar); 67,7 (C-1''); 57,6 (C-2''); 55,3 (C-4''); 26,3 (C-5''); 24,5 (C-6''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,03, $[M+H]^+ = 404$. **Anal.** ($C_{21}H_{20}F_3N_3O_2$, 403,40) % experimental (% teórico): C: 62,53 (62,38); H: 5,00 (5,06); N: 10,42 (10,20).

Síntesis de (2,4,6-trimetilfenil)(3-(2-piperidinoetoxi)indazol-1-il) cetona (34, NP91)

Se realiza a partir de 300 mg (1,04 mmol) de **57 (NP90)**, 98 mg (1,29 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)piperidina, 978 mg (3,00 mmol) de Cs_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 40 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 18 h. Rendimiento: 112 mg (28%).

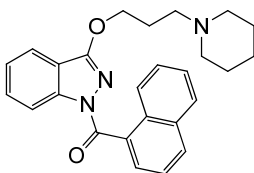
Aceite. **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz, CDCl_3) δ : 8,50 (d, 1H, 4-H); 7,61 (d, 1H, 7-H); 7,56 (t, 1H, 5-H); 7,31 (t, 1H, 6-H); 6,81 (s, 2H, Ar); 4,40 (t, 2H, 1''-H); 2,82 (t, 2H, 2''-H); 2,51 (sa, 2H, 4-H''); 2,26 (s, 6H, 2CH₃); 2,11 (s, 3H, CH₃); 1,62 (sa, 4H, 5-H''); 1,41 (sa, 2H, 6-H''). **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz, CDCl_3) δ : 170,1 (C-1'); 159,4 (C-3); 140,5 (C-7a); 138,5 (C, Ar); 134,3 (C, Ar); 133,4 (C, Ar); 130,4 (C-5); 127,8 (C, Ar); 124,6 (C-6); 119,7 (C-7); 117,8 (C-3a); 116,1 (C-4); 65,9 (C-1''); 56,4 (C-2''); 54,5 (C-4''); 24,9 (CH₃); 23,4 (C-6''); 21,2 (2CH₃); 19,3 (C-5''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 3,22, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 393,32$. **Anal.** ($\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$, 391,51) % experimental (% teórico): C: 73,63 (73,50); H: 7,47 (7,28); N: 10,73 (10,61).

Síntesis de (4-cloro-3-piridinil)(3-(2-piperidinoetoxi)indazol-1-il) cetona (35, NP94)

Se realiza a partir de 200 mg (0,73 mmol) de **63 (NP85)**, 166 mg (0,9 mmol) de hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)piperidina, 800 mg (2,45 mmol) de Cs_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (30:70). Tiempo de reacción: 66 h. Rendimiento: 32 mg (11%).

P.F. = 97-99 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 9,10 (d, 1H, Ar); 8,41 (d, 1H, Ar); 8,31 (dd, 1H, 4-H); 7,66 (d, 1H, 7-H); 7,58 (td, 1H, 5-H); 7,41 (d, 1H, Ar); 7,34 (t, 1H, 6-H); 4,56 (t, 2H, 1''-H); 2,91 (t, 2H, 2''-H); 2,59 (s, 4H, 4-H'); 1,64 - 1,63 (m, 4H, 5-H'); 1,42 - 1,40 (m, 2H, 6-H'). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 165,0 (C-1'); 161,0 (C-3); 155,0 (C, Ar); 152,0 (C, Ar); 141,5 (C-7a); 141,0 (C, Ar); 132 (C, Ar); 129 (C, Ar); 126 (C-5); 124 (C-6); 120 (C-7); 118 (C-3a); 117 (C-4); 67,5 (C-1''); 57,0 (C-2''); 55,0 (C-4''); 25,0 (C-5''); 24,0 (C-6''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 2,79, [M+H]⁺ = 385,56. **Anal.** (C₂₀H₂₁ClN₄O₂, 384,86) % experimental (% teórico): C: 62,42 (60,63); H: 5,50 (5,22); N: 14,56 (13,24).

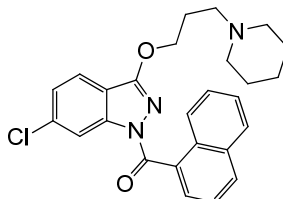
Síntesis de (1-naftil)(3-(3-piperidinopropoxi)indazol-1-il)cetona (36, NP124)



Se realiza a partir de 250 mg (0,87 mmol) de **47 (NP77)**, 213 mg (1,04 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, 240 mg (1,74 mmol) de K₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (96:4). Tiempo de reacción: 72 h. Rendimiento: 161 mg (47%).

P.F. = 83-86 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,55 (d, 1H, 4-H); 8,01 - 7,90 (m, 3H, Ar); 7,77 (dd, 1H, Ar); 7,69 (d, 1H, 7-H); 7,64 (t, 1H, 5-H); 7,57 (t, 1H, Ar); 7,52 - 7,45 (m, 2H, Ar); 7,40 (t, 1H, 6-H); 4,16 (t, 2H, 1''-H); 2,39 - 2,32 (m, 6H, 3''-H, 5-H'); 1,89 (t, 2H, 2''-H); 1,57 - 1,53 (m, 4H, 6-H'); 1,43 - 1,40 (m, 2H, 7-H'). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 168,8 (C-1'); 160,2 (C-3); 141,6 (C-7a); 133,8 (C, Ar); 133,0 (C, Ar); 131,2 (C, Ar); 130,8 (C, Ar); 128,7 (C-5); 127,9 (C, Ar); 127,2 (C, Ar); 126,5 (C, Ar); 126,0 (C, Ar); 125,0 (C, Ar); 124,8 (C-6); 120,3 (C-7); 118,7 (C-3a); 116,6 (C-4); 68,4 (C-1''); 56,1 (C-3''), 54,9 (C-5''); 26,5 (C-2''); 26,1 (C-6''); 24,7 (C-7''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,21, [M+H] = 415. **Anal.** (C₂₆H₂₇N₃O₂, 413,51) % experimental (% teórico): C: 75,36 (75,52); H: 6,84 (6,58); N: 9,91 (10,16).

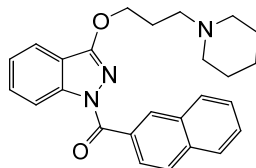
Síntesis de (6-cloro-3-(3-piperidinopropoxi)indazol-1-il)(1-naftil)cetona (37, NP145)



Se realiza a partir de 100 mg (0,31 mmol) de **48 (NP143)**, 76 mg (0,37 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, 128 mg (0,93 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 40 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (40:60). Tiempo de reacción: 20h. Rendimiento: 59,1 mg (43%).

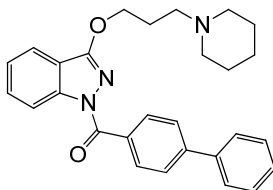
Aceite. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,52 (s, 1H, 4-H); 7,84 (d, 2H, Ar); 7,77 - 7,73 (m, 1H, Ar); 7,65 (d, 1H, Ar); 7,48 - 7,33 (m, 4H, 7-H, Ar); 7,21 (dd, 1H, 5-H); 4,20 (t, 2H, 1''-H); 2,22 - 2,15 (m, 6H, 3''-H, 5-H''); 1,78 - 1,69 (m, 2H, 2''-H); 1,42 - 1,36 (m, 4H, H6''); 1,27 (7-H''). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 168,7 (C-1'); 159,7 (C-3); 141,9 (C-7a); 137,2 (C, Ar); 133,8 (C, Ar); 132,4 (C, Ar); 131,4 (C, Ar); 131,1 (C, Ar); 128,8 (C-5); 128,2 (C, Ar); 127,4 (C, Ar); 126,6 (C, Ar); 125,8 (C, Ar); 122,4 (C-6); 121,1 (C-7); 117,2 (C-3a); 116,8 (C-4); 68,7 (C-1''); 56,1 (C-3''); 54,9 (C-5''); 26,6 (C-2''); 26,3 (C-6''); 24,8 (C-7''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,51, $[M+H] = 448,27$. **Anal.** ($C_{26}H_{26}ClN_3O_2$, 415,89) % experimental (% teórico): C: 69,24 (69,71); H: 6,03 (5,85); N: 9,58 (9,38).

Síntesis de (2-naftil)(3-(3-piperidino)propoxi)indazol-1-il)cetona (**38, NP153**)



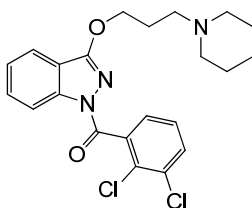
Se realiza a partir de 140 mg (0,49 mmol) de **49 (NP47)**, 119 mg (0,58 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, 135 mg (0,98 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (98:2). Tiempo de reacción: 24h. Rendimiento: 72 mg (36%).

Aceite. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,57 (d, 1H, 4-H); 8,14 (dd, 1H, Ar); 7,98 - 7,89 (m, 3H, Ar); 7,72 (d, 1H, 7-H); 7,65 - 7,55 (m, 4H, 5-H, Ar); 7,38 (t, 1H, 6-H); 4,44 (t, 2H, 1''-H); 2,53 (t, 2H, 3''-H); 2,43 (s, 4H, 5-H''); 2,12 - 2,07 (m, 2H, 2''-H); 1,62 - 1,57 (m, 4H, 6-H''); 1,45 (d, 2H, 7-H''). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 166,3 (C-1'); 158,8 (C-3); 140,7 (C-7a); 133,7 (C, Ar); 131,3 (C, Ar); 129,3 (C, Ar); 128,3 (C-5); 127,0 (C, Ar); 126,6 (C, Ar); 126,2 (C, Ar); 125,9 (C, Ar); 125,4 (C, Ar); 123,4 (C-6); 118,8 (C-7); 116,7 (C-3a); 115,4 (C-4); 67,0 (C-1''); 54,9 (C-3''); 53,5 (C-5''); 25,3 (C-2''); 24,7 (C-6''); 23,2 (C-7''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,33, $[M+H] = 414,29$. **Anal.** ($C_{26}H_{27}N_3O_2$, 413,51) % experimental (% teórico): C: 74,78 (73,64); H: 6,01 (6,50); N: 10,90 (9,81).

Síntesis de (1,1'-bifenil-4-il)(3-(3-piperidinopropoxi)indazol-1-il)cetona (39, NP174)

A partir de 250 mg (0,79 mmol) de **58 (NP87)**, 195 mg (0,95 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, 220 mg (1,59 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (98:2). Tiempo de reacción: 24 h. Rendimiento: 191 mg (55%).

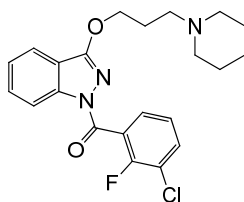
Aceite. 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,54 (d, 1H, 4-H); 8,22 (d, 2H, Ar); 7,69 (m, 4H, 7-H, Ar); 7,62 (td, 1H, 5-H); 7,49 (t, 2H, Ar); 7,42 - 7,35 (m, 2H, 6-H, Ar); 4,47 (t, 2H, 1''-H); 2,51 (t, 2H, 3''-H); 2,41 (s, 4H, 5-H''); 2,12 - 2,07 (m, 2H, 2''-H); 1,62 - 1,55 (m, 4H, 6-H''); 1,46 - 1,42 (m, 2H, 7-H''). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 166,0 (C-1'); 158,8 (C-3); 143,4 (C, Ar); 140,6 (C-7a); 139,2 (C, Ar); 131,4 (C, Ar); 130,6 (C, Ar); 129,3 (C, Ar); 127,9 (C, Ar); 127,0 (C-5); 126,3 (C, Ar); 125,4 (C, Ar); 123,4 (C-6); 118,8 (C-7); 116,7 (C-3a); 115,4 (C-4); 67,2 (C-1''); 54,9 (C-3''); 53,6 (C-5''); 25,6 (C-2''); 25,0 (C-6''); 23,4 (C-7''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 3,52, $[M+H] = 440,20$. **Anal.** ($C_{28}H_{29}N_3O_2$, 439,55) % experimental (% teórico): C: 76,77 (76,51); H: 6,41 (6,65); N: 9,17 (9,56).

Síntesis de (2,3-diclorofenil)(3-(3-piperidinopropoxi)indazol-1-il) cetona (40, NP120)

Se realiza a partir de 250 mg (0,81 mmol) de **52 (NP44)**, 188 mg (0,98 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, 224 mg (1,62 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se disuelve en diclorometano y, al adicionar una pequeña cantidad de hexano, precipita el producto final puro que se recupera por filtración. Tiempo de reacción: 72 h. Rendimiento: 184 mg (52%).

P.F. = 85-88 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,51 (d, 1H, 4-H); 7,70 (d, 1H, 7-H); 7,63 (d, 1H, 5-H); 7,58 (dd, 1H, Ar); 7,42 - 7,37 (m, 2H, Ar); 7,31 (t, 1H, 6-H); 4,27 (t, 2H, 1''-H); 2,46 - 2,37 (m, 6H, 3''-H, 5-H''); 1,98 (q, 2H, 2''-H); 1,61 - 1,54 (m, 4H, 6-H''); 1,45 - 1,42 (m, 2H, 7-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 164,2 (C-1'); 159,4 (C-3); 139,6 (C-7a); 136,5 (C, Ar); 132,2 (C, Ar); 130,4 (C, Ar); 129,5 (C-5); 129,0 (C, Ar); 126,2 (C, Ar); 126,1 (C, Ar); 123,9 (C-6); 118,9 (C-7); 117,6 (C-3a); 115 (C-4); 67,3 (C-1''); 54,8 (C-3''); 53,51 (C-5''); 25,2 (C-6''); 24,8 (C-2''); 23,3 (C-7''). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,28, [M+H]⁺ = 433. **Anal.** (C₂₂H₂₃Cl₂N₃O₂, 432,34) % experimental (% teórico): C: 61,12 (60,97); H: 5,36 (5,43); N: 9,72 (9,66).

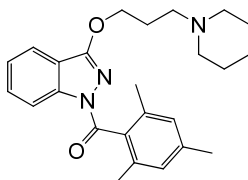
Síntesis de (3-cloro-2-fluorofenil)(3-(3-piperidinopropoxi)indazol-1-il) cetona (41, NP129)



Se realiza a partir de 70 mg (0,24 mmol) de **54 (NP105)**, 59 mg (0,29 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, 66 mg (0,48 mmol) de K₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 30 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : acetonitrilo (40:60). Tiempo de reacción: 72h. Rendimiento: 49,7 mg (50%).

P.F. = 78-80 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,46 (d, 1H, 4-H); 7,68 (d, 1H, 7-H); 7,62 (td, 1H, 5-H); 7,59 - 7,50 (m, 2H, Ar); 7,39 (td, 1H, Ar); 7,20 (td, 1H, 6-H); 4,32 (t, 2H, 1''-H); 2,47 (t, 2H, 3''-H); 2,40 (t, 4H, 5''-H); 2,05 - 1,98 (m, 2H, 2''-H); 1,61 - 1,56 (m, 4H, 6-H''); 1,46 - 1,42 (m, 2H, 7-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 162,4 (C-1'); 159,2 (C-3); 155,8 (C, Ar); 152,5 (C, Ar); 139,7 (C-7a); 131,7 (C, Ar); 129,5 (C-5); 127,5 (C, Ar); 124,1 (C-6); 123,3 (C, Ar); 118,9 (C-7); 117,6 (C-3a); 114,9 (C-4); 67,2 (C-1''); 54,7 (C-3''); 53,5 (C-5''); 25,2 (C-2''); 25,0 (C-6''); 23,3 (C-7''). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,40, [M+H] = 416. **Anal.** (C₂₂H₂₃ClF₂N₃O₂, 415,89) % experimental (% teórico): C: 63,54 (63,81); H: 5,57 (5,62); N: 10,10 (9,98).

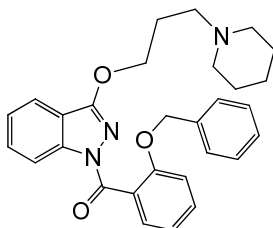
Síntesis de (2,4,6-trimetilfenil)(3-(3-piperidinopropoxi)indazol-1-il) cetona (42, NP128)



Se realiza a partir de 250 mg (0,89 mmol) de **57 (NP90)**, 219 mg (1,07 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, 246 mg (1,78 mmol) de K₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (90:10). Tiempo de reacción: 72h. Rendimiento: 247 mg (68%).

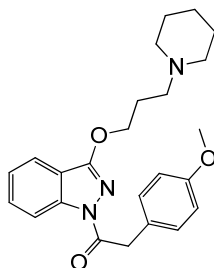
Aceite. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,62 (d, 1H, 4-H); 7,46 (t, 1H, 7-H); 7,40 (t, 1H, 5-H); 7,16 (t, 1H, 6-H); 6,95 (s, 2H, Ar); 4,40 (t, 2H, 1''-H); 2,55 (s, 6H, 3''-H, 5-H''); 2,33 (s, 9H, 3CH₃); 2,17 (q, 2H, 2''-H); 1,64 - 1,58 (m, 4H, 6-H''); 1,47 - 1,41 (m, 2H, 7-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 167,7 (C-1'); 147,8 (C-3); 141,8 (C-Ar); 140,8 (C-7a); 136,7 (C, Ar); 129,5 (C, Ar); 129,2 (C, Ar); 127,4 (C-5); 121,2 (C-6); 120,2 (C-7); 116,3 (C-3a); 114,8 (C-4); 56,1 (C-1''); 54,8 (C-5''); 47,0 (C-3''); 27,1 (C-2''); 26,1 (2CH₃); 24,6 (CH₃); 21,7 (C-7''); 20,9 (C-6''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,72, [M+H]⁺ = 406. **Anal.** (C₂₅H₃₁N₃O₂, 405,53) % experimental (% teórico): C: 74,04 (74,32); H: 7,70 (7,70); N: 10,36 (10,28).

Síntesis de (2-benciloxifenil)(3-((3-piperidino)propoxi)indazol-1-il) cetona (**43**, NP148)



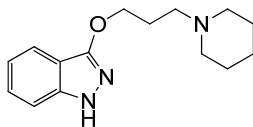
Se realiza a partir de 200 mg (0,58 mmol) de **59 (NP147)**, 285 mg (1,40 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, 241 mg (1,74 mmol) de K₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 60 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (80:20). Tiempo de reacción: 48h. Rendimiento: 34 mg (12%).

Aceite. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,45 (sa, 1H, 4-H); 7,67 (dd, 1H, 7-H); 7,59 (t, 1H, 5-H); 7,50 (dd, 1H, Ar); 7,42 (td, 1H, Ar); 7,36 (t, 1H, 6-H); 7,21 - 7,14 (m, 5H, Ar); 7,06 (t, 1H, Ar); 7,00 (d, 1H, Ar); 5,11 (s, 2H, CH₂); 4,26 (t, 2H, 1''-H); 2,55 - 2,49 (m, 6H, 3''-H, 5-H''); 2,06 (t, 2H, 2''-H); 1,68 (s, 4H, 6-H''); 1,47 (s, 2H, 7-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 170,4 (C-1'); 154,9 (C-3); 139,9 (C-7a); 135,8 (C, Ar); 130,5 (C, Ar); 129,2 (C, Ar); 128,2 (C, Ar); 127,3 (C, Ar); 126,5 (C, Ar); 125,3 (C, Ar); 124,9 (C, Ar); 119,6 (C-5); 123,3 (C-6); 119,6 (C, Ar); 118,6 (C-7); 114,9 (C-3a); 111,8 (C-4); 98,6 (C, Ar); 69,2 (CH₂); 66,5 (C-1''); 54,6 (C-3''); 53,2 (C-5''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 3,32, [M+H] = 470,29. **Anal.** (C₂₉H₃₁N₃O₃, 469,57) % experimental (% teórico): C: 74,18 (73,99); H: 6,65 (6,64); N: 8,95 (8,69).

Síntesis de (4-metoxibencil)(3-(3-piperidinopropoxi)indazol-1-il) cetona (45, NP137)

Se realiza a partir de 250 mg (0,88 mmol) de **64 (NP122)**, 209 mg (1,06 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, 360 mg (2,63 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 50 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (80:20). Tiempo de reacción: 48h. Rendimiento: 39 mg (11%).

P.F. = 67-69 °C. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,33 (d, 1H, 4-H); 7,62 (d, 1H, 7-H); 7,52 (td, 1H, 5-H); 7,35 - 7,29 (m, 3H, 6-H, Ar); 6,86 (d, 2H, Ar); 4,54 (t, 2H, 1''-H); 4,30 (s, 2H, 2'-H); 3,78 (OCH_3); 2,66 (t, 2H, 3''-H); 2,56 (t, 4H, 5-H''); 2,24 - 2,16 (m, 2H, 2''-H); 1,74 - 1,67 (m, 4H, H_6''); 1,51 - 1,47 (m, 2H, 7-H'). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 169,8 (C-1'); 158,2 (C, Ar); 157,6 (C-3); 139,7 (C-7a); 129,7 (C, Ar); 129,3 (C-5); 125,5 (C, Ar); 123,1 (C-6); 118,6 (C-7); 116,8 (C-3a); 114,9 (C-4); 113,0 (C, Ar); 66,8 (C-1''); 54,7 (C-3''); 54,3 (OCH_3); 53,4 (C-5''); 39,8 (C-2'); 24,9 (C-2''); 24,3 (C-6''); 23,0 (C-7'). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,06, $[M+H] = 409$. **Anal.** ($C_{24}H_{29}N_3O_3$, 407,51) % experimental (% teórico): C: 70,74 (70,53); H: 7,17 (7,02); N: 10,31 (10,04).

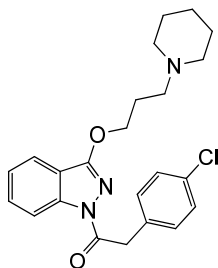
8.1.2.3. Síntesis de los derivados de 1H-indazol-3-ol sustituidos en posición N3**Síntesis de 1H-3-(3-piperidinopropoxi)indazol (67, NP135)**

Se realiza a partir de 1 g (4,86 mmol) de (1-etil)(3-hidroxiindazol-1-il)cetona (**65**), 2,18 mg (10,67 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina, 2 g (14,55 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 100 mL de 2-butanona. La reacción se calienta a reflujo con agitación. Cuando haya terminado, el crudo de reacción se lleva a sequedad y se redisuelve en diclorometano para extraer con agua. Se evapora el disolvente de la fase orgánica y se añade una disolución de HOH en etanol 0,4 M. Se deja agitando durante 1 h, se filtran las sales y se elimina el disolvente del crudo. Se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes agua : metanol (50:50). Tiempo de reacción: 4 días. Rendimiento: 520 mg (41 %).

Aceite. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 9,29 (s, 1H, OH); 7,66 (d, 1H, 4-H); 7,37 - 7,27 (m, 2H, 5-H, 7-H); 7,06 (t, 1H, 6-H); 4,43 (t, 2H, 1''-H); 2,58 (t, 2H, 3''-H); 2,48 (s, 4H, 5-H''); 2,11 (q, 2H, 2''-H); 1,63 (q, 4H, 6-H''); 1,47 - 1,45 (m, 2H, 7-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 139,6 (C-3); 132,4 (C-7a); 128,7 (C, 5); 123,5 (C-6); 118,6 (C-7); 116,4 (C-3a); 115,1 (C-4); 65,5 (C-1''); 54,2 (C-3''); 52,7 (C-5''); 22,6 (C-2''); 21,5 (C-6''); 21,0 (C-7''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 9 min., tr: 5,22, [M+H] = 260,5. **Anal.** (C₁₅H₂₁N₃O, 259,35) % experimental (% teórico): C: 69,21 (69,47); H: 8,40 (8,16); N: 15,97 (16,20).

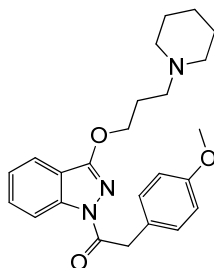
8.1.2.4. Síntesis de los derivados de 1H-indazol-3-ol sustituidos en posiciones N1 y N3 a partir de los compuestos sustituidos en N3

Síntesis de (4-clorobencil)(3-(3-piperidinopropoxi)indazol-1-il) cetona (44, NP132)



Se realiza a partir de 250 mg (0,96 mmol) de **67 (NP135)**, 0,3 mL (2,10 mmol) de cloruro de 2-(4-clorofenil)acetilo, 398 mg (2,88 mmol) de K₂CO₃, KI en cantidades catalíticas y 20 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (50:50). Tiempo de reacción: 24h. Rendimiento: 19 mg (5 %).

P.F. = 148-153 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,35 (d, 1H, 4-H); 7,63 (d, 1H, 7-H); 7,54 (t, 1H, 5-H); 7,36 - 7,26 (m, 5H, 6-H, Ar); 4,56 (t, 2H, 1''-H); 4,33 (s, 2H, 2'-H); 2,96 - 2,80 (m, 6H, 3''-H, 5-H''); 2,43 (t, 2H, 2''-H); 1,94 (d, 4H, 6-H'); 1,60 (d, 2H, 7-H''). **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ: 168,9 (C-1'); 158,0 (C-3); 139,7 (C-7a); 131,9 (C, Ar); 131,8 (C, Ar); 130,0 (C, Ar); 129,6 (C-5); 127,7 (C, Ar); 123,4 (C-6); 118,6 (C-7); 116,5 (C-3a); 114,9 (C-4); 66,0 (C-1''); 54,3 (C-3''); 52,9 (C-5''); 40,1 (C-2'); 23,4 (C-2''); 22,6 (C-6''); 21,8 (C-7''). **HPLC-MS (ES+)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,32, [M+H] = 413. **Anal.** (C₂₃H₂₆ClN₃O₂, 411,92) % experimental (% teórico): C: 67,06 (66,77); H: 6,36 (6,60); N: 10,20 (10,01).

Síntesis de (4-metoxibencil)(3-(3-piperidinopropoxi)indazol-1-il) cetona (45, NP137)

Se realiza a partir de 250 mg (0,96 mmol) de **67 (NP135)**, 0,2 mL (1,44 mmol) de cloruro de 2-(4-metoxifenil)acetilo, 398 mg (2,88 mmol) de K_2CO_3 , KI en cantidades catalíticas y 20 mL de 2-butanona. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash con la mezcla de disolventes diclorometano : metanol (75:25). Tiempo de reacción: 24h. Rendimiento: 49,5 mg (13 %).

P.F. = 67-69 °C. **1H -RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,33 (d, 1H, 4-H); 7,62 (d, 1H, 7-H); 7,52 (td, 1H, 5-H); 7,35 - 7,29 (m, 3H, 6-H, Ar); 6,86 (d, 2H, Ar); 4,54 (t, 2H, 1''-H); 4,30 (s, 2H, 2'-H); 3,78 (OCH_3); 2,66 (t, 2H, 3''-H); 2,56 (t, 4H, 5-H''); 2,24 - 2,16 (m, 2H, 2''-H); 1,74 - 1,67 (m, 4H, H_6''); 1,51 - 1,47 (m, 2H, 7-H''). **^{13}C -RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 169,8 (C-1'); 158,2 (C-3); 157,6 (C, Ar); 139,7 (C-7a); 129,7 (C, Ar); 129,3 (C-5); 125,5 (C, Ar); 123,1 (C-6); 118,6 (C-7); 116,8 (C-3a); 114,9 (C-4); 113,0 (C, Ar); 66,8 (C-1''); 54,7 (C-3''); 54,3 (C-2'); 53,4 (C-5''); 39,8 (OCH_3); 24,9 (C-2''); 24,3 (C-6''); 23,0 (C-7''). **HPLC-MS (ES⁺)**: acetonitrilo / agua 15/85, tg: 8 min., tr: 3,06, $[M+H] = 409$. **Anal.** ($C_{24}H_{29}N_3O_3$, 407,51) % experimental (% teórico): C: 70,74 (70,53); H: 7,17 (7,02); N: 10,31 (10,04).

8.2. FARMACOLOGÍA**8.2.1. Ensayo de inhibición enzimática de AChE y BuChE**

Para la determinación de la acción de los compuestos como inhibidores de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) (Sigma Chemical Co., human recombinante) y butirilcolinesterasa (BuChE) (Sigma Chemical Co., suero humano) se ha seguido el método de Ellman¹²⁵.

La solución de ensayo consiste en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 8, 400 μ M 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), 0,05 U / ml AChE o 0,024 U / ml BuChE, y 800 μ M yoduro de acetiltiocolina o 500 μ M butiriltiocolina como sustratos de las enzimas AChE y BuChE, respectivamente. Los compuestos a ensayar se añaden a la solución de ensayo antes de la enzima. Una vez añadida la enzima, se preincuba durante un periodo de 5 minutos a 30°C antes de añadir el sustrato. Los cambios de absorbancia a 412 nm se miden durante 5 minutos en un espectrofotómetro UV/Vis, Multiskan Spectrum.

La actividad enzimática a cada concentración de compuesto se expresa como porcentaje de actividad con respecto al control en ausencia de compuesto. La IC_{50} se define como la concentración de compuesto que inhibe la actividad enzimática un 50% con respecto al control de enzima sin tratar.

Estos ensayos fueron realizados por la Dra. Concepción Pérez en el Instituto de Química Médica del CSIC.

8.2.2. Ensayo de competición enzimática

Para estudiar el mecanismo de acción de los compuestos frente a la enzima BuChE, se realizó un análisis cinético empleando el mismo método del ensayo de inhibición enzimática. En este caso, los experimentos se llevaron a cabo usando varias concentraciones del sustrato, así como varias concentraciones de inhibidor. Los resultados se representaron en graficas Lineweaver-Burk y Cornish-Bodwen dobles-recíprocas.

8.2.3. Ensayo de inhibición enzimática de BACE-1

El ensayo de la enzima BACE-1 se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante disponible de Invitrogen¹²⁸.

Brevemente, el ensayo *in vitro* de la enzima BACE-1 se realizó usando el procedimiento de transferencia resonante de la energía de fluorescencia (FRET). Se utilizó un sustrato de péptido basado en APP-(rodamina-EVNLDAEFK- quencher, K_m de 20 mM) que lleva la mutación *Swedish* y que contiene una rodamina como donante de fluorescencia y un aceptor de la extinción en cada extremo. El sustrato intacto es débilmente fluorescente y se convierte en altamente fluorescente tras la ruptura enzimática. Los ensayos se llevaron a cabo en 50 mM de tampón de acetato de sodio, pH 4,5, en una concentración final de enzima (1 U / ml). El inhibidor se ensaya a una concentración de 10 μ M.

La mezcla se incubó durante 60 min a 25°C bajo condiciones de oscuridad y luego se detuvo añadiendo 2,5 M de acetato de sodio. Se midió la fluorescencia con un lector de microplacas FLUOstar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Alemania) a 545 nm de excitación y 585 nm emisión. El ensayo ha sido validado por el fabricante.

Estos ensayos fueron realizados por la Dra. Concepción Pérez en el Instituto de Química Médica del CSIC.

8.2.4. Ensayo en tejido deferente de ratón aislado (efecto cannabinoide)

La actividad cannabinoide de los derivados carbonílicos de 1-indazolilo sintetizados fueron evaluados a nivel funcional, evaluando su efecto *in vitro* en ensayos en tejido deferente de ratón, un tejido donde frecuentemente se han estudiado y caracterizado efectos cannabinoides^{151,129}.

En este tejido, los agonistas cannabinoides, actuando sobre receptores cannabinoides presinápticos, disminuyen la liberación de ATP y de noradrenalina desde la terminal nerviosa e inhiben las contracciones inducidas por estimulación eléctrica. Los antagonistas de los receptores cannabinoides de forma competitiva y superable, bloquean los efectos inhibitorios de los agonistas. El receptor cannabinoide que parece estar más implicado en este efecto es el CB1^{152,153,154}. La metodología utilizada en este estudio se describe a continuación.

Se usaron ratones macho ICR, cuyos conductos deferentes se aislaron según la técnica descrita por Hughes¹⁵⁵, y se montaron en un baño de órganos. Se sometieron a periodos alternos de estimulación eléctrica (trenes de 5 pulsos rectangulares de 70 V, 15 Hz y 2 ms de duración cada uno, que se aplican a cada minuto) y de descanso (10 min). La fuerza isométrica se monitorizó utilizando un sistema de registro y análisis de datos MacLab.

El efecto agonista de los nuevos compuestos se evaluó realizando curvas concentración-respuesta no acumulativas (10^{-7} - $1,82 \times 10^{-5}$ M). Su efecto se comparó con el del agonista cannabinoide sintético no selectivo CB1/CB2 WIN55212-2. Para los compuestos que han presentado un perfil agonista interesante, se probó si su efecto es bloqueado y revertido por los antagonistas selectivos CB1 (AM251) y/o CB2 (AM630) (Tabla 13).

Estos estudios fueron realizados en la Facultad de Medicina de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid por el grupo de la Prof. Isabel Martín-Fontelles.

Tabla 13. Porcentaje del efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil para cada concentración de los compuestos **22**, **29**, **34**, **40**, **42**, **43** y **45**, solos o en presencia de los ligandos antagonistas selectivos AM251 (CB1) o AM630 (CB2).

Compuesto	% (10^{-7} M)	% (3×10^{-7} M)	% (9×10^{-7} M)	% ($2,7 \times 10^{-6}$ M)	% ($8,1 \times 10^{-6}$ M)	% ($1,82 \times 10^{-5}$ M)
22 (NP43)	1,6	5,6	17,3	27,8	56,3	80,8 ^a
22 (NP43) + AM251	-0,3	3,4	7,1	13,0	44,8	80,4 ^a
22 (NP43) + AM630	0,1	0,9	5,4	12,5	48,3	79,3 ^a
29 (NP152)	-0,7	1,4	8,6	28,6	69,2	93,7
29 (NP152) + AM251	-7,7	-13,9	-18,2	-16,6	27,8	73,3
29 (NP152) + AM630	-8,6	-7,9	-2,6	15,7	73,6	92,0
34 (NP91)	2,6	3,6	6,5	14,0	30,7	56,8
34 (NP91) + AM251	-0,4	1,4	7,6	8,7	19,8	40,7
34 (NP91) + AM630	-12,2	-14,2	-13,6	-14,3	-4,7	1,3
40 (NP120)	1,4	6,2	14,3	27,4	89,3	96,6
40 (NP120) + AM251	-0,7	2,0	8,7	15,2	65,3	89,8
40 (NP120) + AM630	-3,0	0,0	10,4	18,2	62,7	85,5
42 (NP128)	-3,3	-1,8	-2,3	-3,9	54,2	87,0
42 (NP128) + AM251	-8,9	-11,6	-13,5	-13,9	43,7	87,9
42 (NP128) + AM630	-4,0	-1,5	8,4	18,8	53,5	75,7
43 (NP148)	-12,5	-10,7	6,4	31,4	74,4	94,7
43 (NP148) + AM251	-6,8	-6,8	-4,5	-1,0	26,4	74,8
43 (NP148) + AM630	-3,1	1,1	-0,5	-3,0	29,7	77,5
45 (NP137)	-2,4	-0,3	16,9	42,5	88,5	96,0
45 (NP137) + AM251	-9,4	-13,8	-10,5	-1,6	61,9	89,7
45 (NP137) + AM630	-9,2	-9,4	-1,4	14,7	68,5	94,3

^a % (2×10^{-5} M)

8.2.5. Estudio de la acción de agonistas CB2 en modelos celulares de Alzheimer

Efectos sobre viabilidad celular y actividad proliferativa:

Para los ensayos de MTT se sembraron 200.000 células por pocillo, en triplicados en una placa de 96, en presencia de concentraciones crecientes (0 - 20 μ M) de **43 (NP137)** y **45 (NP148)**, durante 72 horas.

Los linfoblastos fueron cultivados a una densidad de 1×10^6 células \times mL⁻¹ en presencia y ausencia de 5 μ M de **43 (NP137)** y **45 (NP148)**. 72 horas después, se realizaron recuentos del número de células en el contador de células TC10TM de Bio-Rad Laboratories S.A. El resultado obtenido es la media de varios experimentos diferentes llevados a cabo en 9 individuos control y 11 pacientes de EA.

Efectos sobre proliferación celular y estado de fosforilación de Akt y pRb:

Los linfoblastos procedentes de individuos controles y EA se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times mL⁻¹ en medio RPMI con 10% de suero, en presencia de 5 μ M **43 (NP137)** o **45 (NP148)** durante tres días. La proliferación se determinó por recuento de células en un contador automático y los niveles de proteínas se determinaron por *Western blot*. Los valores obtenidos corresponden con la media de cuatro experimentos independientes tomados de líneas celulares de distintos individuos.

El estudio completo con modelos celulares de Alzheimer se llevó a cabo por el grupo de M^a Ángeles Martín Requero, responsable del Departamento del laboratorio de Medicina celular y molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid.

8.2.6. Estudio in vivo

Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en ratones macho transgénicos para la APP, mutación sueca, Tg2576, colonia ya establecida en el Instituto Cajal (El animalario del IC está registrado en el ministerio con el nº 28079-31-a y los procedimientos han sido aprobados por el comité de bioética del CSIC).

Los tratamientos se realizaron en los ratones macho Tg APP de 12 m cuando el déficit cognitivo era evidente. Los grupos incluían 8-10 ratones silvestres (*wild type*) y Tg APP, que recibieron vehículo o alguno de los compuestos en estudio (al menos 4). La dosis a inyectar se determinó de acuerdo con su potencia en estudios farmacológicos previos. Las pruebas de comportamiento se realizaron tras administración aguda o subcrónica (4 semanas). El número de animales previsto era: agudo n=30; subcrónico n=50.

Prueba de comportamiento: Todos los procedimientos se llevan a cabo a la misma hora del día (9.00-14.00h) en ambiente insonorizado. La prueba que se ha realizado es de aprendizaje espacial donde se entrena a los animales para que encuentren una plataforma escondida en un tanque de agua de 100 cm de diámetro. Se realizan cuatro pruebas diarias durante 5 días y se registra la latencia para llegar a la plataforma (Noldus software, TNH)

8.3. ESTUDIOS COMPUTACIONALES

En general los fármacos presentan especificidad estructural, es decir, ejercen su efecto cuando interactúan con alguna macromolécula biológica. Conocida la diana terapéutica, teórica o experimentalmente, que está involucrada en el proceso biológico que es estudiado, se diseñan nuevos fármacos que van a ejercer su efecto sobre dicha diana.

En el proceso de *docking*, una vez analizado el sitio de unión de la diana, se busca la mejor interacción entre la diana y el posible ligando, pudiendo estudiar la energía de interacción. Las etapas de los estudios de anclaje son:

1. Construcción y optimización de los correspondientes ligandos
2. Procesamiento de la diana terapéutica.
3. Construcción y optimización inicial del complejo ligando-diana
4. Estudios de *docking*. Análisis y refinamiento

Todos los cálculos se realizaron en estaciones de trabajo *Silicon Graphics*. En primer lugar se construyeron los ligandos correspondientes empleando el modulo Sketch implementado en Sybyl 7.2¹³⁴. Se optimizaron con el campo de fuerzas MMFF94^{136,137} y con el método de minimización de Gradiente conjugado, hasta alcanzar el gradiente 0,001 kcal·mol⁻¹·Å⁻¹. Posteriormente, se construyeron manualmente los complejos receptor-ligando, teniendo en cuenta los modelos desarrollados en nuestro grupo y la información de la que disponemos sobre las distintas estructuras proteicas (BACE-1, CB2 y BuChE).

El modelo cannabinoide que se empleó para los estudios de *docking* ha sido construido y refinado en nuestro grupo. Se utilizó el modelo de CB2 en su forma activa (resultados sin publicar)^{88,98}. En cuanto al sistema colinérgico los estudios se realizaron con la estructura 3D de la enzima BuChE humana (código PDB: 1P0I)¹³⁹. Finalmente, la estructura 3D de la enzima BACE-1 empleada es la del complejo BACE-1-S8Z (Código pdb: 4ACX)¹⁵⁰.

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron empleando dos aproximaciones diferentes. Para la formación de los complejos ligando-CB2R y ligando-BuChE se empleó el programa FlexiDock implementado en Sybyl 7.2. Los complejos ligandos-BACE-1 se estudiaron con la utilización del programa AutoDock¹³⁵.

FlexiDock emplea Algoritmos Genéticos (AG) que es un método muy rápido para la generación de conformaciones. FlexiDock analiza todas las posibles conformaciones del ligando en el interior del centro activo de la diana (7 Å desde el ligando) estudiando tanto las cadenas laterales de los receptores como las conformaciones de los ligandos, es decir, permite llevar a cabo un *docking* flexible tanto en el ligando como en el receptor.

AutoDock está formado por dos subprogramas (AutoGrid y AutoDock). El primero calcula una red de puntos o *grid* que describe la región de interés de la diana, mientras que el segundo utiliza los resultados del primero para realizar el *docking* del ligando, al que se le da la máxima flexibilidad conformacional mediante algoritmos genéticos. En concreto se utilizó una red de dimensiones 70x70x70 centrada entre los Asp32 y Asp228 del bolsillo catalítico de la enzima BACE-1. Para los cálculos se empleó algoritmos genéticos lamarckiano (LGA) y se generaron 100 poses.

Las diferentes poses tanto obtenidas con Flexidock como con AutoDock se clasificaron en familias en función del *scoring* generado en cada programa. La clasificación y análisis de las diferentes familias se basaron en:

- a) *Scoring* y población de cada familia clasificada (por RMS y energía).
- b) Concordancia entre los datos experimentales descritos del sitio de unión y los obtenidos en los modelos teóricos. El tipo de interacción fue examinada con el programa LPC (*Ligand Protein Contact*)¹³⁸, que calcula todas las interacciones entre el receptor y el ligando.

Las mejores soluciones de los complejos de cada estudio se optimizaron de nuevo empleando el campo de fuerza y las cargas MMFF94 hasta un gradiente 0,01.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. International, A. s. D. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia, an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>
2. WHO. Dementia: a Public Health Priority. http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564458_eng.pdf
3. Gupta, M.; Kaur, H.; Grover, S.; Kukreti, R. Pharmacogenomics and treatment for dementia induced by Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics* **2008**, *9*, 895-903.
4. Leon, R.; Garcia, A. G.; Marco-Contelles, J. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Res Rev* **2013**, *33*, 139-89.
5. Holtzman, D. M.; Morris, J. C.; Goate, A. M. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* **2011**, *3*, 77sr1.
6. Latypova, X.; Martin, L. 2015: which new directions for Alzheimer's disease? *Front Cell Neurosci* **2014**, *8*, 417.
7. Garcia, M. L.; Cleveland, D. W. Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Curr Opin Cell Biol* **2001**, *13*, 41-48.
8. Piaceri, I.; Nacmias, B.; Sorbi, S. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)* **2013**, *5*, 167-77.
9. Johnston, J. A.; Liu, W. W.; Todd, S. A.; Coulson, D. T.; Murphy, S.; Irvine, G. B.; Passmore, A. P. Expression and activity of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* **2005**, *33*, 1096-100.
10. Science guides Alzheimer's disease drug development. <http://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/SpecialFeatures/ucm361513.htm> (Dec 15, 2015).
11. Watkins, P. B.; Zimmerman, H. J.; Knapp, M. J.; Gracon, S. I.; Lewis, K. W. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA* **1994**, *271*, 992-8.
12. Klafki, H. W.; Staufenbiel, M.; Kornhuber, J.; Wiltfang, J. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain* **2006**, *129*, 2840-55.
13. Coulthard, E.; Singh-Curry, V.; Husain, M. Treatment of attention deficits in neurological disorders. *Curr Opin Neurol* **2006**, *19*, 613-8.
14. Villarroya, M.; Garcia, A. G.; Marco-Contelles, J.; Lopez, M. G. An update on the pharmacology of galantamine. *Expert Opin Investig Drugs* **2007**, *16*, 1987-98.
15. Claassen, J. A.; Jansen, R. W. Cholinergically mediated augmentation of cerebral perfusion in Alzheimer's disease and related cognitive disorders: the cholinergic-vascular hypothesis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **2006**, *61*, 267-71.
16. Anand, P.; Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* **2013**, *36*, 375-99.
17. Matsuzono, K.; Sato, K.; Kono, S.; Hishikawa, N.; Ohta, Y.; Yamashita, T.; Deguchi, K.; Nakano, Y.; Abe, K. Clinical Benefits of Rivastigmine in the Real World Dementia Clinics of the Okayama Rivastigmine Study (ORS). *J Alzheimers Dis* **2015**, *48*, 757-63.

18. Chohan, M. O.; Iqbal, K. From tau to toxicity: emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **2006**, 10, 81-7.
19. Alzforum: Therapeutics. <http://www.alzforum.org/therapeutics> (Feb 27, 2016).
20. Schenk, D.; Basi, G. S.; Pangalos, M. N. Treatment strategies targeting amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, 2, a006387.
21. Anand, R.; Gill, K. D.; Mahdi, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* **2014**, 76 Pt A, 27-50.
22. Dolan, P. J.; Johnson, G. V. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2010**, 13, 595-603.
23. Perez, D. I.; Martinez, A.; Gil, C.; Campillo, N. E. From bitopic inhibitors to multitarget drugs for Alzheimer's disease future treatment. *Curr Med Chem* **2015**.
24. Páez, J. A.; Campillo, N. E.; Pérez, C.; González-Naranjo, P.; Pérez-Macias, N.; de Ceballos, M. L.; Martín-Requero, A.; Alquézar, C.; Martín, M. I.; Girón, R.; Sánchez-Robles, E.; Romero, J. Nueva familia de derivados carbonílicos de 1-indazolilo con propiedades cannabinoides y/o colinérgicas y/o reguladoras del péptido beta-amiloide. P201531846, **2015**.
25. Woods, K. W.; Fischer, J. P.; Claiborne, A.; Li, T.; Thomas, S. A.; Zhu, G. D.; Diebold, R. B.; Liu, X.; Shi, Y.; Klinghofer, V.; Han, E. K.; Guan, R.; Magnone, S. R.; Johnson, E. F.; Bouska, J. J.; Olson, A. M.; de Jong, R.; Oltersdorf, T.; Luo, Y.; Rosenberg, S. H.; Giranda, V. L.; Li, Q. Synthesis and SAR of indazole-pyridine based protein kinase B/Akt inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2006**, 14, 6832-46.
26. Davie, B. J.; Christopoulos, A.; Scammells, P. J. Development of M1 mAChR allosteric and bitopic ligands: prospective therapeutics for the treatment of cognitive deficits. *ACS Chem Neurosci* **2013**, 4, 1026-48.
27. Nickols, H. H.; Conn, P. J. Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiol Dis* **2014**, 61, 55-71.
28. Lane, J. R.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **2013**, 34, 59-66.
29. Mohr, K.; Schmitz, J.; Schrage, R.; Trankle, C.; Holzgrabe, U. Molecular alliance-from orthosteric and allosteric ligands to dualsteric/bitopic agonists at G protein coupled receptors. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, 52, 508-16.
30. Bajda, M.; Guzior, N.; Ignasik, M.; Malawska, B. Multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease treatment. *Curr Med Chem* **2011**, 18, 4949-75.
31. Guzior, N.; Wieckowska, A.; Panek, D.; Malawska, B. Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* **2015**, 22, 373-404.
32. Bolognesi, M. L.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Andrisano, V.; Rosini, M.; Minarini, A.; Melchiorre, C. Design, synthesis, and biological evaluation of conformationally restricted rivastigmine analogues. *J Med Chem* **2004**, 47, 5945-52.
33. Prati, F.; Uliassi, E.; Bolognesi, M. L. Two diseases, one approach: multitarget drug discovery in Alzheimer's and neglected tropical diseases. *Med. Chem. Commun.* **2014**, 5, 853-861.

34. Zheng, H.; Fridkin, M.; Youdim, M. From Single Target to Multitarget/Network Therapeutics in Alzheimer's Therapy. *Pharmaceuticals* **2014**, *7*, 113-135.
35. Zimmermann, G. R.; Lehar, J.; Keith, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today* **2007**, *12*, 34-42.
36. Huang, W.; Lv, D.; Yu, H.; Sheng, R.; Kim, S. C.; Wu, P.; Luo, K.; Li, J.; Hu, Y. Dual-target-directed 1,3-diphenylurea derivatives: BACE 1 inhibitor and metal chelator against Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 5610-5.
37. Prati, F.; De Simone, A.; Bisignano, P.; Armirotti, A.; Summa, M.; Pizzirani, D.; Scarpelli, R.; Perez, D. I.; Andrisano, V.; Perez-Castillo, A.; Monti, B.; Massenzio, F.; Polito, L.; Racchi, M.; Favia, A. D.; Bottegoni, G.; Martinez, A.; Bolognesi, M. L.; Cavalli, A. Multitarget drug discovery for Alzheimer's disease: triazinones as BACE-1 and GSK-3 β inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54*, 1578-82.
38. Boinpally, R.; Chen, L.; Zukin, S. R.; McClure, N.; Hofbauer, R. K.; Periclou, A. A novel once-daily fixed-dose combination of memantine extended release and donepezil for the treatment of moderate to severe Alzheimer's disease: two phase I studies in healthy volunteers. *Clin Drug Investig* **2015**, *35*, 427-35.
39. Gauthier, S.; Molinuevo, J. L. Benefits of combined cholinesterase inhibitor and memantine treatment in moderate-severe Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **2013**, *9*, 326-31.
40. Grossberg, G. T.; Manes, F.; Allegri, R. F.; Gutierrez-Robledo, L. M.; Gloger, S.; Xie, L.; Jia, X. D.; Pejovic, V.; Miller, M. L.; Perhach, J. L.; Graham, S. M. The safety, tolerability, and efficacy of once-daily memantine (28 mg): a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe Alzheimer's disease taking cholinesterase inhibitors. *CNS Drugs* **2013**, *27*, 469-78.
41. Porsteinsson, A. P.; Grossberg, G. T.; Mintzer, J.; Olin, J. T.; Memantine, M. E. M. D. S. G. Memantine treatment in patients with mild to moderate Alzheimer's disease already receiving a cholinesterase inhibitor: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Curr Alzheimer Res* **2008**, *5*, 83-9.
42. Agis-Torres, A.; Solhuber, M.; Fernandez, M.; Sanchez-Montero, J. M. Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* **2014**, *12*, 2-36.
43. Zhu, Y.; Xiao, K.; Ma, L.; Xiong, B.; Fu, Y.; Yu, H.; Wang, W.; Wang, X.; Hu, D.; Peng, H.; Li, J.; Gong, Q.; Chai, Q.; Tang, X.; Zhang, H.; Li, J.; Shen, J. Design, synthesis and biological evaluation of novel dual inhibitors of acetylcholinesterase and beta-secretase. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17*, 1600-13.
44. Piazzini, L.; Cavalli, A.; Colizzi, F.; Belluti, F.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Recanatini, M.; Andrisano, V.; Rampa, A. Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 423-6.
45. Incerti, M.; Flammini, L.; Saccani, F.; Morini, G.; Comini, M.; Coruzzi, M.; Barocelli, E.; Ballabeni, V.; Bertoni, S. Dual-acting drugs: an in vitro study of nonimidazole histamine H3 receptor antagonists combining anticholinesterase activity. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1143-9.
46. Roche, O.; Rodriguez Sarmiento, R. M. A new class of histamine H3 receptor antagonists derived from ligand based design. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 3670-5.

47. Nepovimova, E.; Uliassi, E.; Korabecny, J.; Pena-Altamira, L. E.; Samez, S.; Pesaresi, A.; Garcia, G. E.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bergamini, C.; Fato, R.; Lamba, D.; Roberti, M.; Kuca, K.; Monti, B.; Bolognesi, M. L. Multitarget drug design strategy: quinone-tacrine hybrids designed to block amyloid-beta aggregation and to exert anticholinesterase and antioxidant effects. *J Med Chem* **2014**, 57, 8576-89.
48. Ismaili, L.; Refouvelet, B.; Benchekroun, M.; Brogi, S.; Brindisi, M.; Gemma, S.; Campiani, G.; Filipic, S.; Agbaba, D.; Esteban, G.; Unzeta, M.; Nikolic, K.; Butini, S.; Marco-Contelles, J. Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **2016**.
49. Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **1990**, 346, 561-4.
50. Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **1993**, 365, 61-5.
51. Pertwee, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* **1997**, 74, 129-80.
52. Ashton, J. C.; Friberg, D.; Darlington, C. L.; Smith, P. F. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* **2006**, 396, 113-6.
53. Gong, J. P.; Onaivi, E. S.; Ishiguro, H.; Liu, Q. R.; Tagliaferro, P. A.; Brusco, A.; Uhl, G. R. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* **2006**, 1071, 10-23.
54. Campillo, N. E.; Paez, J. A. Cannabinoid system in neurodegeneration: new perspectives in Alzheimer's disease. *Mini Rev Med Chem* **2009**, 9, 539-59.
55. Campbell, V. A.; Gowran, A. Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids? *Br J Pharmacol* **2007**, 152, 655-62.
56. Ramirez, B. G.; Blazquez, C.; Gomez del Pulgar, T.; Guzman, M.; de Ceballos, M. L. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* **2005**, 25, 1904-13.
57. Farkas, S.; Nagy, K.; Palkovits, M.; Kovacs, G. G.; Jia, Z.; Donohue, S.; Pike, V.; Halldin, C.; Mathe, D.; Harkany, T.; Gulyas, B.; Csiba, L. [(1)(2)(5)I]SD-7015 reveals fine modalities of CB(1) cannabinoid receptor density in the prefrontal cortex during progression of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **2012**, 60, 286-91.
58. Fagan, S. G.; Campbell, V. A. The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. *Br J Pharmacol* **2014**, 171, 1347-60.
59. Benito, C.; Tolon, R. M.; Pazos, M. R.; Nunez, E.; Castillo, A. I.; Romero, J. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol* **2008**, 153, 277-85.
60. Fernandez-Ruiz, J.; Pazos, M. R.; Garcia-Arencibia, M.; Sagredo, O.; Ramos, J. A. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol Cell Endocrinol* **2008**, 286, S91-6.

61. Ehrhart, J.; Obregon, D.; Mori, T.; Hou, H.; Sun, N.; Bai, Y.; Klein, T.; Fernandez, F.; Tan, J.; Shytle, R. D. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation* **2005**, 2, 29.
62. Martin-Moreno, A. M.; Reigada, D.; Ramirez, B. G.; Mechoulam, R.; Innamorato, N.; Cuadrado, A.; de Ceballos, M. L. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* **2011**, 79, 964-73.
63. Martin-Moreno, A. M.; Brera, B.; Spuch, C.; Carro, E.; Garcia-Garcia, L.; Delgado, M.; Pozo, M. A.; Innamorato, N. G.; Cuadrado, A.; de Ceballos, M. L. Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers beta-amyloid levels and improves cognitive performance in Tg APP 2576 mice. *J Neuroinflammation* **2012**, 9, 8.
64. Contestabile, A. The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res* **2011**, 221, 334-40.
65. Flores, M. E.; Segura, J. E. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci* **2005**, 6, 315-326.
66. Greig, N. H.; Utsuki, T.; Yu, Q.; Zhu, X.; Holloway, H. W.; Perry, T.; Lee, B.; Ingram, D. K.; Lahiri, D. K. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin* **2001**, 17, 159-65.
67. Lane, R. M.; Potkin, S. G.; Enz, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* **2006**, 9, 101-24.
68. Ballard, C.; Perry, E. Butyrylcholinesterase: Potencial importance for the symptoms and progression of cognitive decline in people with dementia. *Acta Neurol Taiwan* **2003**, 12, 109-113.
69. Alvarez, A.; Alarcon, R.; Opazo, C.; Campos, E. O.; Munoz, F. J.; Calderon, F. H.; Dajas, F.; Gentry, M. K.; Doctor, B. P.; De Mello, F. G.; Inestrosa, N. C. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J Neurosci* **1998**, 18, 3213-23.
70. Nordberg, A.; Ballard, C.; Bullock, R.; Darreh-Shori, T.; Somogyi, M. A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease. *Prim Care Companion CNS Disord* **2013**, 15.
71. Kumar, R.; Nordberg, A.; Darreh-Shori, T. Amyloid-beta peptides act as allosteric modulators of cholinergic signalling through formation of soluble BAβAChEs. *Brain* **2016**, 139, 174-92.
72. Reale, M.; Di Nicola, M.; Velluto, L.; D'Angelo, C.; Costantini, E.; Lahiri, D. K.; Kamal, M. A.; Yu, Q. S.; Greig, N. H. Selective acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors reduce amyloid-beta ex vivo activation of peripheral chemo-cytokines from Alzheimer's disease subjects: exploring the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Curr Alzheimer Res* **2014**, 11, 608-22.
73. Giacobini, E. Selective inhibitors of butyrylcholinesterase: a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease? *Drugs Aging* **2001**, 18, 891-8.
74. Kamal, M. A.; Al-Jafari, A. A.; Yu, Q. S.; Greig, N. H. Kinetic analysis of the inhibition of human butyrylcholinesterase with cymserine. *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1760, 200-6.

75. Dickson, D. W. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* **1997**, 56, 321-39.
76. Glenner, G. G.; Wong, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **1984**, 120, 885-90.
77. Citron, M. Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease--promise and challenge. *Trends Pharmacol Sci* **2004**, 25, 92-7.
78. Cole, S. L.; Vassar, R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener* **2007**, 2, 22.
79. Heinrichson, R. L.; Sinha, S. *BACE: Lead target for orchestrated therapy of Alzheimer's Disease*. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, **2010**.
80. Ghosh, A. K.; Brindisi, M.; Tang, J. Developing beta-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **2012**, 120 Suppl 1, 71-83.
81. Barten, D. M.; Meredith, J. E., Jr.; Zaczek, R.; Houston, J. G.; Albright, C. F. Gamma-secretase inhibitors for Alzheimer's disease: balancing efficacy and toxicity. *Drugs R D* **2006**, 7, 87-97.
82. Evin, G.; Lessene, G.; Wilkins, S. BACE inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease: focus on bioactivity. *Recent Pat CNS Drug Discov* **2011**, 6, 91-106.
83. Sinha, S.; Anderson, J. P.; Barbour, R.; Basi, G. S.; Caccavello, R.; Davis, D.; Doan, M.; Dovey, H. F.; Frigon, N.; Hong, J.; Jacobson-Croak, K.; Jewett, N.; Keim, P.; Knops, J.; Lieberburg, I.; Power, M.; Tan, H.; Tatsuno, G.; Tung, J.; Schenk, D.; Seubert, P.; Suomensari, S. M.; Wang, S.; Walker, D.; Zhao, J.; McConlogue, L.; John, V. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **1999**, 402, 537-40.
84. Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A. K.; Zhang, X. C.; Tang, J. Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science* **2000**, 290, 150-3.
85. Liu, Q. F.; Fan, Z. P.; Luo, X. D.; Sun, J.; Zhang, Y.; Ding, Y. Q. Epstein-Barr virus-associated pneumonia in patients with post-transplant lymphoproliferative disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* **2010**, 12, 284-91.
86. Gonzalez-Naranjo, P.; Campillo, N. E.; Perez, C.; Paez, J. A. Multitarget cannabinoids as novel strategy for Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res* **2013**, 10, 229-39.
87. Gonzalez-Naranjo, P.; Perez-Macias, N.; Campillo, N. E.; Perez, C.; Aran, V. J.; Giron, R.; Sanchez-Robles, E.; Martin, M. I.; Gomez-Canas, M.; Garcia-Arencibia, M.; Fernandez-Ruiz, J.; Paez, J. A. Cannabinoid agonists showing BuChE inhibition as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* **2013**, 73C, 56-72.
88. Montero, C.; Campillo, N. E.; Goya, P.; Paez, J. A. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *Eur J Med Chem* **2005**, 40, 75-83.
89. Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem* **2003**, 278, 41141-7.

90. Judson, R. *Genetic Algorithms and Their Use in Chemistry in Reviews in Computational Chemistry*. K.B. Lipkowitz and D.B. Boyd ed.; VCH Publishers: 1997; Vol. 10.
91. Zoni, G.; Picciola, G. Alkylation of 3-hydroxy-1H-1-substituted-indazole. *Farmaco. Edizione Scientifica* **1968**, 23, 490-&.
92. Patel, S.; Vuillard, L.; Cleasby, A.; Murray, C. W.; Yon, J. Apo and inhibitor complex structures of BACE (beta-secretase). *J. Mol. Biol.* **2004**, 343, 407-416.
93. Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (Feb 18, 2016).
94. Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, 289, 739-45.
95. Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A. N.; Elstner, M.; Entel, P.; Buss, V. The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J Mol Biol* **2004**, 342, 571-83.
96. Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **2007**, 318, 1258-65.
97. Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Griffith, M. T.; Roth, C. B.; Jaakola, V. P.; Chien, E. Y.; Velasquez, J.; Kuhn, P.; Stevens, R. C. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure* **2008**, 16, 897-905.
98. Ramos, J.; Cruz, V. L.; Martinez-Salazar, J.; Campillo, N. E.; Paez, J. A. Dissimilar interaction of CB1/CB2 with lipid bilayers as revealed by molecular dynamics simulation. *Phys Chem Chem Phys* **2011**, 13, 3660-8.
99. Huang, W.; Yu, H.; Sheng, R.; Li, J.; Hu, Y. Identification of pharmacophore model, synthesis and biological evaluation of N-phenyl-1-arylamide and N-phenylbenzenesulfonamide derivatives as BACE 1 inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2008**, 16, 10190-7.
100. John, S.; Thangapandian, S.; Sakkiah, S.; Lee, K. W. Potent BACE-1 inhibitor design using pharmacophore modeling, in silico screening and molecular docking studies. *BMC Bioinformatics* **2011**, 12 Suppl 1, S28.
101. Semighini, E. P. In Silico Design of Beta-Secretase Inhibitors in Alzheimer's Disease. *Chem Biol Drug Des* **2015**, 86, 284-90.
102. Muthusamy, K.; Singh Kh, D.; Chinnasamy, S.; Nagamani, S.; Krishnasamy, G.; Thiagarajan, C.; Premkumar, P.; Anusuyadevi, M. High throughput virtual screening and E-pharmacophore filtering in the discovery of new BACE-1 inhibitors. *Interdiscip Sci* **2013**, 5, 119-26.
103. Fischer, E. Ueber Orthohydrazinbenzoesäure. *Ber. Dtsch. Chem Ges.* **1880**, 13, 679-682.
104. Evans, N. A.; Whelan, D. J.; Johns, R. B. tautomerism in 5-pyrazolone series 1(H)-5-pyrazolones and indazolones. *Tetrahedron* **1965**, 21, 3351-&.
105. Krishnamurthy, M.; Dogra, S. K. Photophysical behaviour of 3-indazolinone. *Chemical Physics* **1986**, 103, 325-333.

106. Ballesteros, P.; Elguero, J.; Claramunt, R. M.; Faure, R.; Foces-Foces, M. C.; Heérnandez-Cano, F.; Rousseau, A. The structure of indazolinone and derivatives in the solid state and in solution: an X-ray and nuclear magnetic resonance study. *J Chem Soc Perkin Trans II* **1986**, 1677-1681.
107. Claramunt, R. M.; Sanz, D.; Lopez, C.; Pinilla, E.; Torres, M. R.; Elguero, J.; Nioche, P.; Raman, C. S. The structures of Indazolin-3-one (=1,2-Dihidro-3*H*-indazol-3-one) and 7-Nitroindazolin-3-one. *Helvetica Chimica Acta* **2009**, 92, 1952-1962.
108. Elguero, J. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*. Pergamon Press: Oxford, 1984; Vol. 5, p 167-304.
109. Fischer, E.; Blochmann, R. Some new indazol derivative. *Ber. Dtsch. Chem Ges.* **1902**, 35, 2315-2319.
110. Schindler, R.; Fleischhauer, I.; Hofgen, N.; Sauer, W.; Egerland, U.; Poppe, H.; Heer, S.; Szelenyi, I.; Kutscher, B.; Engel, J. 1,5-Disubstituted indazol-3-ols with anti-inflammatory activity. *Archiv der Pharmazie* **1998**, 331, 13-21.
111. Arán, V. J.; Flores, M.; Munoz, P.; Páez, J. A.; SánchezVerdú, P.; Stud, M. Analogues of cytostatic, fused indazolinones: Synthesis, conformational analysis and cytostatic activity against HeLa cells of some 1-substituted indazolols, 2-substituted indazolinones, and related compounds. *Liebigs Annalen* **1996**, 683-691.
112. Arán, V. J.; Ochoa, C.; Boiani, L.; Buccino, P.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; González, M.; Montero, D.; Nogal, J. J.; Gomez-Barrio, A.; Azqueta, A.; de Cerain, A. L.; Piro, O. E.; Castellano, E. E. Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 3197-3207.
113. Randall, A.; Duval, F. Regioselective O-Alkylations of Indazolinone Using (Cyanomethylene)triphenylphosphorane. *Synlett* **2009**, 16, 2673-2675.
114. Arold, H. Umlagerungen in der Reihe der Carblthoxy- und Carbathoxy-methyl-6-nitro-indazolone. *Journal für Pracktische Chemie* **1964**, 25, 18-25.
115. Baiocchi, L.; Corsi, G.; Palazzo, G. Synthesis, Properties, and Reactions of 1*h*-Indazol-3-Ols and 1,2-Dihydro-3*h*-Indazol-3-Ones. *Synthesis-Stuttgart* **1978**, 633-648.
116. Modeer, T.; Yucel-Lindberg, T. Benzydamine reduces prostaglandin production in human gingival fibroblasts challenged with interleukin-1 beta or tumor necrosis factor alpha. *Acta Odontologica Scandinavica* **1999**, 57, 40-45.
117. Selwood, D. L.; Brummell, D. G.; Budworth, J.; Burtin, G. E.; Campbell, R. O.; Chana, S. S.; Charles, I. G.; Fernandez, P. A.; Glen, R. C.; Goggin, M. C.; Hobbs, A. J.; Kling, M. R.; Liu, Q.; Madge, D. J.; Meillerais, S.; Powell, K. L.; Reynolds, K.; Spacey, G. D.; Stables, J. N.; Tatlock, M. A.; Wheeler, K. A.; Wishart, G.; Woo, C. K. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazoles and indazoles as activators of the nitric oxide receptor, soluble guanylate cyclase. *J. Med. Chem* **2001**, 44, 78-93.
118. Zoller, G.; Baringhaus, K. H.; Heuer, H.; Muller, G.; Petry, S. Indazole derivatives as inhibitors of hormone sensitive lipase. US-20050197348 A1, 8 SEP 2005, 2005.
119. Schelkun; Robert, M.; Yuen, P.-W. Therapeutic pyrazolo[3,4-*b*]pyridines and indazoles background of the invention. WO-2006056873 A2, 2006.

120. Stiff, C.; Graber, D. R.; Thorarensen, A.; Wakefield, B. D.; Marotti, K. R.; Melchior, E. P.; Sweeney, M. T.; Han, F.; Rohrer, D. C.; Zurenko, G. E.; Romero, D. L. Bacterial translation inhibitors, 1-acylindazol-3-ols as anthranilic acid mimics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 6293-6297.
121. Choong, I. G., S. Methods and compositions of treating a flaviviridae family viral infection. 20100015093, 2010.
122. Eacho, P. I.; Foxworthy-Mason, P. S.; Lin, H. S.; Lopez, J. E.; Mosior, M. K.; Richett, M. E. 3-oxo-1, 3-dihydro-indazole-2-carboxylic acid amide derivatives as phospholipase inhibitors. In Google Patents: 2004.
123. Huang, Z.; Long, Z.; Su, Z.; Yang, S. Novel cyclosporin derivatives for the treatment and prevention of a viral infection. In Google Patents: 2012.
124. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. *Structure determination of organic chemistry*. Springer: 2000.
125. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V., Jr.; Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95.
126. Giacobini, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* **2003**, 28, 515-22.
127. Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V. beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem Pharmacol* **2003**, 65, 407-16.
128. Invitrogen. BACE-1 FRET Assay Kit, Red. Protocol. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/L0724.pdf> (Jun 3, 2013).
129. Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Elrick, D. B.; Mechoulam, R.; Corbett, A. D. Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* **1992**, 105, 980-4.
130. Munoz, U.; Bartolome, F.; Bermejo, F.; Martin-Requero, A. Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol Aging* **2008**, 29, 1474-84.
131. Bonda, D. J.; Bajic, V. P.; Spremo-Potparevic, B.; Casadesus, G.; Zhu, X.; Smith, M. A.; Lee, H. G. Review: cell cycle aberrations and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* **2010**, 36, 157-63.
132. Judson, R. *Genetic Algorithms and Their Use in Chemistry in Reviews in Computational Chemistry*. 1997; Vol. 10.
133. SYBYL 7.2, T. I., St. Louis, Missouri, USA.
134. SYBYL 7.2, Tripos Inc., St. Louis, Missouri, USA.
135. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **2009**, 30, 2785-91.
136. Halgren, T. A. Merck molecular force field .2. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. *J. Comput. Chem* **1996**, 17, 520-552.

137. Halgren, T. A. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J. Comput. Chem* **1999**, 20, 720-729.
138. Sobolev, V.; Sorokine, A.; Prilusky, J.; Abola, E. E.; Edelman, M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics* **1999**, 15, 327-32.
139. Bone, R.; Shenvi, A. B.; Kettner, C. A.; Agard, D. A. Serine protease mechanism: structure of an inhibitory complex of alpha-lytic protease and a tightly bound peptide boronic acid. *Biochemistry* **1987**, 26, 7609-14.
140. Kryger, G.; Harel, M.; Giles, K.; Toker, L.; Velan, B.; Lazar, A.; Kronman, C.; Barak, D.; Ariel, N.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2000**, 56, 1385-94.
141. Čolović, M. B.; Krstić, D. Z.; Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. Z.; Vasić, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* **2013**, 11, 315-335.
142. Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A. N.; Elstner, M.; Entel, P.; Buss, V. The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 angstrom crystal structure. *Journal of Molecular Biology* **2004**, 342, 571-583.
143. Jaakola, V. P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y. T.; Lane, J. R.; Ijzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A(2A) Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science* **2008**, 322, 1211-1217.
144. Tuccinardi, T.; Ferrarini, P. L.; Manera, C.; Ortore, G.; Saccomanni, G.; Martinelli, A. Cannabinoid CB2/CB1 selectivity. Receptor modeling and automated docking analysis. *J Med Chem* **2006**, 49, 984-94.
145. Xie, X. Q.; Chen, J. Z.; Billings, E. M. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins* **2003**, 53, 307-19.
146. McAllister, S. D.; Rizvi, G.; Anavi-Goffer, S.; Hurst, D. P.; Barnett-Norris, J.; Lynch, D. L.; Reggio, P. H.; Abood, M. E. An aromatic microdomain at the cannabinoid CB(1) receptor constitutes an agonist/inverse agonist binding region. *J Med Chem* **2003**, 46, 5139-52.
147. McAllister, S. D.; Tao, Q.; Barnett-Norris, J.; Buehner, K.; Hurst, D. P.; Guarnieri, F.; Reggio, P. H.; Nowell Harmon, K. W.; Cabral, G. A.; Abood, M. E. A critical role for a tyrosine residue in the cannabinoid receptors for ligand recognition. *Biochem Pharmacol* **2002**, 63, 2121-36.
148. Raitio, K. H.; Salo, O. M.; Nevalainen, T.; Poso, A.; Jarvinen, T. Targeting the cannabinoid CB2 receptor: mutations, modeling and development of CB2 selective ligands. *Curr Med Chem* **2005**, 12, 1217-37.
149. Poso, A.; Huffman, J. W. Targeting the cannabinoid CB2 receptor: modelling and structural determinants of CB2 selective ligands. *British Journal of Pharmacology* **2008**, 153, 335-346.
150. Swahn, B. M.; Holenz, J.; Kihlstrom, J.; Kolmodin, K.; Lindstrom, J.; Plobeck, N.; Rotticci, D.; Sehgelmeble, F.; Sundstrom, M.; Berg, S.; Falting, J.; Georgievska, B.; Gustavsson, S.; Neelissen, J.; Ek, M.; Olsson, L. L.; Berg, S. Aminoimidazoles as BACE-1 inhibitors: the challenge to achieve in vivo brain efficacy. *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, 22, 1854-9.

151. Thomas, A.; Pertwee, R. G. The bioassay of cannabinoids using the mouse isolated vas deferens. *Methods Mol Med* **2006**, 123, 191-207.
152. Pertwee, R.; Griffin, G.; Fernando, S.; Li, X.; Hill, A.; Makriyannis, A. AM630, a competitive cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* **1995**, 56, 1949-55.
153. Pertwee, R. G.; Griffin, G.; Lainton, J. A.; Huffman, J. W. Pharmacological characterization of three novel cannabinoid receptor agonists in the mouse isolated vas deferens. *Eur J Pharmacol* **1995**, 284, 241-7.
154. Griffin, G.; Fernando, S. R.; Ross, R. A.; McKay, N. G.; Ashford, M. L.; Shire, D.; Huffman, J. W.; Yu, S.; Lainton, J. A.; Pertwee, R. G. Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol* **1997**, 339, 53-61.
155. Hughes, J.; Kosterlitz, H. W.; Leslie, F. M. Effect of Morphine on Adrenergic Transmission in Mouse Vas-Deferens Assessment of Agonist and Antagonist Potencies of Narcotic Analgesics. *British Journal of Pharmacology* **1975**, 53, 371-381.